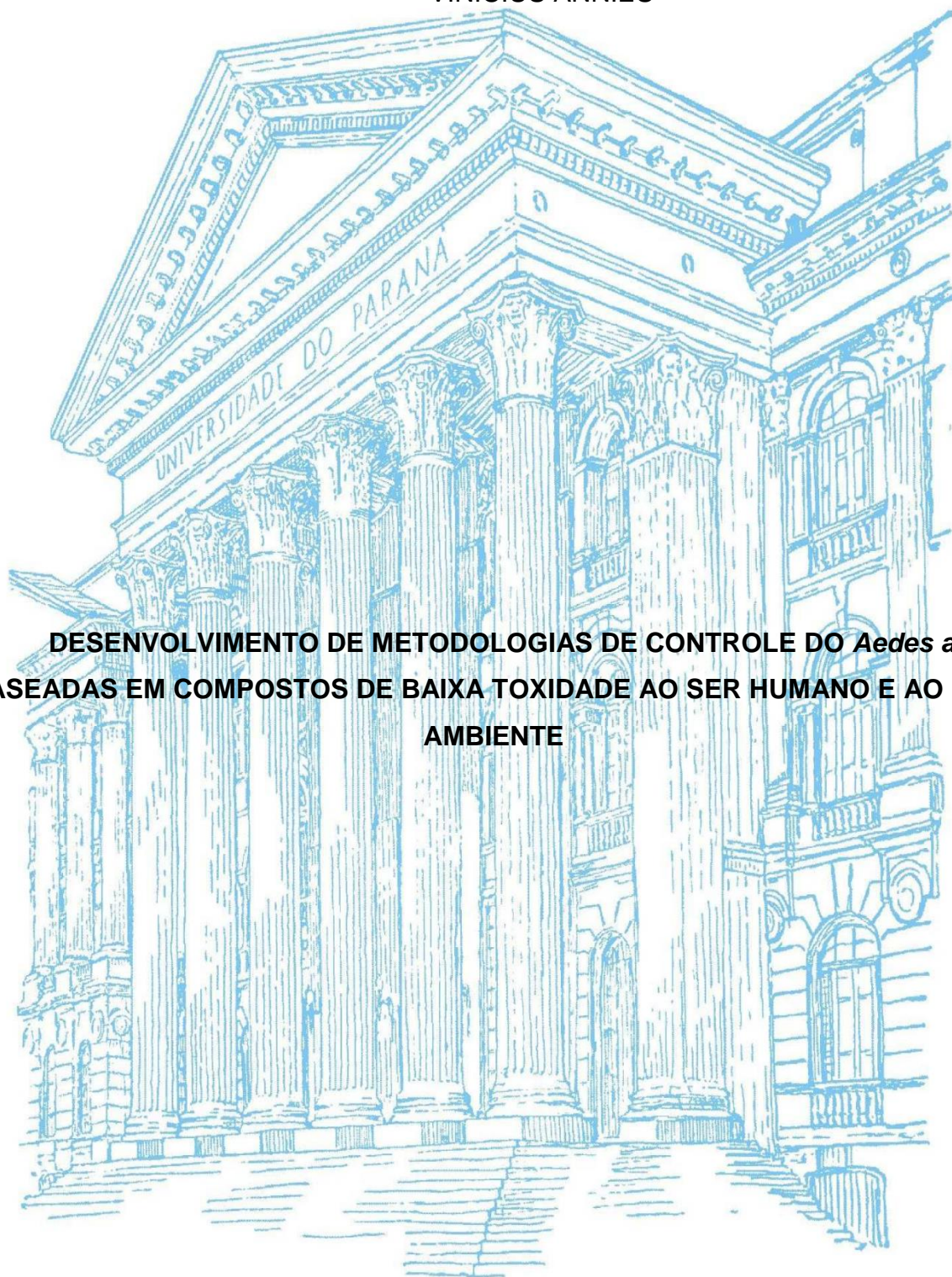


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VINÍCIUS ANNIES

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS DE CONTROLE DO *Aedes aegypti*
BASEADAS EM COMPOSTOS DE BAIXA TOXIDADE AO SER HUMANO E AO MEIO
AMBIENTE**



CURITIBA

2017

VINÍCIUS ANNIES

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS DE CONTROLE DO *Aedes aegypti*
BASEADAS EM COMPOSTOS DE BAIXA TOXIDADE AO SER HUMANO E AO MEIO
AMBIENTE**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Química, no Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Marques

CURITIBA

2017

A615d

Annies, Vinícius

Desenvolvimento de metodologias de controle do *Aedes aegypti* baseadas em compostos de baixa toxicidade ao ser humano e ao meio ambiente /

Vinícius Annies. – Curitiba, 2017.

98 f. : il. color. ; 30 cm.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2017.

Orientador: Francisco de Assis Marques .

Bibliografia: p. 77-83.

1. *Aedes aegypti*. 2. Mosquitos – Controle. 3. Testes de Toxicidade. I. Universidade Federal do Paraná. II. Marques, Francisco de Assis. III. , Título.

CDD: 614.4323

TERMO DE APROVAÇÃO

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS DE CONTROLE DO
AEDES AEGYPTI BASEADAS EM COMPOSTOS DE BAIXA TOXIDADE
AO SER HUMANO E AO MEIO AMBIENTE**

por

VINÍCIUS ANNIES

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química, pela Comissão Examinadora composta por:



Prof. Dr. Francisco de Assis Marques
Orientador
Dep. de Química – UFPR



Prof.ª Dr.ª Rose Maria Carlos
Dep. de Química – UFSCar



Prof. Dr. João Batista Fernandes
Dep. de Química – UFSCar



Prof.ª Dr.ª Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. Daniel da Silveira Rampon
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 26 de abril de 2017.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pela educação e oportunidades que me deram.

Ao Professor Dr. Francisco de Assis Marques, pela orientação, motivação, paciência e auxílio.

À Professora Dra. Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia, pela ajuda durante o trabalho, na correção dos relatórios, pelas contribuições na qualificação e pelo aceite para participar da banca examinadora.

Ao Professor Dr. Daniel da Silveira Rampon pelas contribuições na qualificação e pelo aceite para participar da banca examinadora e futuras contribuições.

À Professora Dra. Rose Maria Carlos, pela ajuda durante o trabalho e pelo aceite para participar da banca examinadora.

Ao Professor Dr. João Batista Fernandes, pelo aceite para participar da banca examinadora.

Ao Professor Mário Antônio Navarro da Silva, pela ajuda, motivação, orientação e também por ter me recebido em seu laboratório durante todo o trabalho realizado.

À Profa. Dra. Carmen Lucia Cardoso pelas contribuições no trabalho.

Ao Professor Dr. Brás Heleno de Oliveira, pelas significativas contribuições na qualificação.

Aos amigos e colegas do LECOSIN, do LEMV e do Departamento de Química pelo companheirismo e auxílio no desenvolvimento do trabalho.

Aos funcionários do PPGQ UFPR pela parceria e pelas contribuições.

Ao Departamento de Química da UFPR, bem como aos professores e funcionários.

A todos que, de uma forma ou de outra, me ajudaram a fazer este trabalho.

A sorte favorece a mente bem
preparada.
(Louis Pasteur)

RESUMO

A fêmea do mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor responsável pela transmissão do vírus da dengue, zika, chikungunya e febre amarela. Enquanto não existe uma vacina eficaz para controle dessas doenças, a única forma de reduzir sua incidência se restringe ao controle do *A. aegypti*.

Desta forma se faz necessário a busca por novos métodos de controle baseados em substâncias com propriedades inseticidas que reduzam o impacto ambiental e que sejam menos tóxicas ao ser humano, bem como minimizem desenvolvimento de resistência por parte do mosquito.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade larvicida de compostos sintéticos, para o controle do *A. aegypti* bem como buscou-se determinar a atividade adulticida e repelente de compostos de origem vegetal e ou de derivados sintéticos frente a adultos de *A. aegypti*.

Os resultados dos estudos nos levaram a identificar um composto com forte ação larvicida, pertencente a uma classe de compostos ainda não empregada para o controle de pragas a nível mundial.

Os estudos também nos possibilitaram determinar alguns compostos responsáveis por uma ação adulticida bem como foi possível determinar a relação entre os compostos, necessária para que se observe o efeito adulticida de forma mais pronunciada.

No que tange ao efeito de repelência, foi sintetizada uma substância, a partir de um produto natural, que apresentou forte ação repelente. Vale a pena ressaltar que essa substância é produzida em apenas uma etapa e utilizando os conceitos da química verde, como solventes atóxicos e elevado rendimento.

Esses resultados abrem perspectivas para pesquisa no sentido de desenvolver um novo larvicida para substituir o temefós, pesticida com amplo espectro de atuação, bem como para o desenvolvimento de um novo adulticida, baseado na presença de compostos naturais, de baixa toxicidade ao ser humano, que poderá ser usado para substitui os piretroides. Também se tem como resultado desse trabalho a possibilidade de se fornecer ao poder público um repelente que pode ser sintetizado em grande escala, a partir de produto natural de baixa toxidade, podendo atender às demandas nacionais sem a necessidade de se importar princípios ativos com ação repelente.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Larvicida. Adulticida. Repelente.

ABSTRACT

The female of the *Aedes aegypti* mosquito is the main vector responsible for the transmission of the dengue virus, zika, chikungunya and yellow fever. While there is no effective vaccine to control these diseases, the only way to reduce their incidence is to control *A. aegypti*.

In this way it is necessary to search for new methods of control based on substances with insecticidal properties that reduce the environmental impact and that are less toxic to the human being, as well as minimize the development of resistance by the mosquito.

The objective of this work was to evaluate the larvicidal activity of synthetic compounds for the control of *A. aegypti* as well as to determine the adulticidal and repellent activity of compounds of plant origin and of synthetic derivatives against adults of *A. aegypti*.

The results of the studies led us to identify a compound with strong larvicidal action, belonging to a class of compounds not yet used for pest control worldwide.

The studies also allowed us to determine some compounds responsible for an adulticidal action as well as it was possible to determine the relationship between the compounds, necessary to observe the adulticidal effect in a more pronounced way.

As regards the effect of repellency, a substance was synthesized from a natural product, which presented a strong repellent action. It is worth mentioning that this substance is produced in only one step and using the concepts of green chemistry, such as non-toxic solvents and high yield.

These results open perspectives for research to develop a new larvicide to replace temephos, a pesticide with a broad spectrum of action, as well as for the development of a new adulticide, based on the presence of natural compounds with low toxicity to humans. Can be used to replace the pyrethroids. The result of this work is also the possibility of providing the public authorities with a repellent that can be synthesized on a large scale from a natural product of low toxicity and can meet national demands without the need to import active ingredients with repellent action.

Key-words: *Aedes aegypti*. Larvicida. Adulticide. Repellent.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Representação do ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	15
FIGURA 2 – 1,1,1-tricloro-2,2- <i>bis</i> (<i>p</i> -clorofenil)etano (DDT).....	17
FIGURA 3 – O, O, O', O'-tetrametil-O, O'-dtioi- <i>p</i> -fenilenofosforotioato (Temefós)....	17
FIGURA 4 – Estruturas dos ácidos crisantêmico e pirétrico.....	18
FIGURA 5 – Estrutura piretrina.	18
FIGURA 6 – Estrutura da N, N-dietil-3-metilbenzamida (DEET).	20
FIGURA 7 – Estrutura da Icaridina e do IR3535.	20
FIGURA 8 – Estereoisômeros do limoneno e da carvona.	22
FIGURA 9 – Estruturas dos isômeros do mentol: (+) e (-)-mentol, (+) e (-)-isomentol, (+) e (-)-neomentol, (+) e (-)-neoisomentol.	23
FIGURA 10 – Estruturas do (+)-canfeno e (-)-canfeno e do borneol e isoborneol. ...	24
FIGURA 11 – Estruturas dos enantiômeros (<i>R</i>) e (<i>S</i>)-carvona e do (<i>R</i>) e (<i>S</i>)-limoneno.	24
FIGURA 12 – Estruturas dos quatro diferente complexos de manganês.	28
FIGURA 13 – Tubos utilizados durante os testes por contato.....	30
FIGURA 14 – Posicionamento da mão na gaiola durante os testes realizados.	41
FIGURA 15 – Estrutura do Malation e do Malaoxon	45
FIGURA 16 – Toxicidade aguda após a aplicação do complexo fac-4meim com o controle através da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), após exposição de 72 horas (A) e 96 horas (B) das larvas de <i>A. aegypti</i>	46
FIGURA 17 – Estrutura dos compostos utilizados durante os testes adu lticidas na câmara de vidro.....	47
FIGURA 18 – Estrutura dos compostos utilizados durante os testes adu lticidas em papel filtro.....	49
FIGURA 19 – Toxicidade aguda após a aplicação da mistura Linalol/PN, do Linalol e PN com o controle através da atividade enzimática das enzimas acetilcolinesterase (AChE).	52
FIGURA 20 – Toxicidade aguda após a aplicação da mistura Linalol/PN, do Linalol e PN com o controle através da atividade enzimática das enzimas esterase alfa (EST- α)....	53

FIGURA 21 – Toxicidade aguda após a aplicação do Linalol e da mistura Linalol/PN com o controle através da atividade enzimática das enzimas acetilcolinesterase (AChE).	57
FIGURA 22 – Toxicidade aguda após a aplicação de cinco concentrações do inseticida com o controle através da atividade enzimática das enzimas acetilcolinesterase (AChE).	57
FIGURA 23 – Toxicidade aguda após a aplicação do Linalol/PN com o controle através da atividade enzimática das enzimas esterase alfa (EST- α).	58
FIGURA 24 – Cromatograma ilustrando o decrescimento da atividade enzimática do ICER-AChE-ee na presença de inibidor padrão a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$	59
FIGURA 25 – Análise termogravimétrica do Linalol para verificar a variação da massa em função da temperatura em um tempo de 60 minutos.	63
FIGURA 26 – Análise termogravimétrica do PN para verificar a variação da massa em função da temperatura em um tempo de 60 minutos.	63
FIGURA 27 – Análise termogravimétrica da mistura Linalol/PN para verificar a variação da massa em função da temperatura em um tempo de 60 minutos.	64
FIGURA 28 – Síntese de derivados do citronelal.	65
FIGURA 29 – Espectro de fragmentação de massas do citronelol.	66
FIGURA 30 – Espectro de RMN de ^1H do citronelol.	67
FIGURA 31 – Espectro de RMN de ^{13}C do citronelol.	67
FIGURA 32 – Cromatograma expandido da reação para obtenção do 7,11-dimetildodeca-10-en-5-ol.	68
FIGURA 33 – Estrutura dos diastereoisômeros do 7,11-dimetildodeca-10-en-5-ol.	69
FIGURA 34 – Síntese do p-mentano-3,8-diol a partir do citronelal.	71
FIGURA 35 – Síntese de derivados da Mentona.	71
FIGURA 36 – Estruturas geral do hetero-ciclos de oxazolidina e do amino-álcool. ..	74
FIGURA 37 – Estrutura racêmica do ciclohex-3-en-1-il(2-metilpiperidin-1-il)metanona.	74

LISTA DE GRÁFICOS E ESQUEMAS

GRÁFICO 1 – Porcentagem de mortalidade larval utilizando os complexos de Manganês, sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> , na concentração de 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com duração de 96 horas.	44
ESQUEMA 1 – Síntese do p-mentano-3,8-diol a partir do (<i>R</i>)-citronelal.	21
ESQUEMA 2 – Representação da catálise enzimática da acetil colilnesterase.	45
ESQUEMA 3 – Fragmentação da molécula do citronelol.	67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Alguns grupos químicos e substâncias representativas utilizados no controle de pragas.....	16
TABELA 2 – Porcentagem de mortalidade larval utilizando os complexos de Manganês, sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> (n = 60) da colônia Rockefeller, na concentração de 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com duração de 24 horas.....	42
TABELA 3 – Porcentagem de mortalidade larval utilizando os complexos de Manganês, sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> (n = 60) da colônia Rockefeller, na concentração de 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com duração de 48 horas.....	42
TABELA 4 – Porcentagem de mortalidade larval utilizando os complexos de Manganês, sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> (n = 60) da colônia Rockefeller, na concentração de 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com duração de 72 horas.....	43
TABELA 5 – Porcentagem de mortalidade larval utilizando os complexos de Manganês, sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> (n = 60) da colônia Rockefeller, na concentração de 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com duração de 96 horas.....	43
TABELA 6 – Concentrações letais (CL) após 24 horas de exposição de larvas de <i>Aedes aegypti</i> aos complexos de manganês.	44
TABELA 7 – Verificação da atividade inseticida e perda da atividade de voo dos compostos individualmente na câmara de vidro (n = 10).	47
TABELA 8 – Verificação da atividade inseticida e perda da atividade de voo dos compostos individualmente variando a quantidade na câmara de vidro (n = 10).	47
TABELA 9 – Verificação da atividade inseticida e perda da atividade de voo da combinação entre os compostos na câmara de vidro (n = 10).	48
TABELA 10 – Verificação da atividade inseticida e perda da atividade de voo com os compostos individualmente em papel filtro (n = 10).	49
TABELA 11 – Verificação da atividade inseticida e perda da atividade de voo com os compostos mais a mistura Linalol/PN.	50
TABELA 12 – Verificação da atividade inseticida e perda da atividade de voo com os compostos individualmente em papel filtro (n = 10).	51

TABELA 13 – Avaliação da atividade inseticida com a mistura dos compostos em papel filtro (n = 10).	52
TABELA 14 – Avaliação da atividade inseticida e perda da atividade de voo com os compostos individualmente em spray (n = 10).	54
TABELA 15 – Avaliação da atividade inseticida e perda da atividade de voo com os compostos em spray (n = 20).	55
TABELA 16 – Avaliação da atividade inseticida e perda da atividade de voo com os compostos em spray (n = 20).	55
TABELA 17 – Resultados ensaios enzimáticos obtidos em biorreatores.	60
TABELA 18 – Composição dos sprays, quantidade dos materiais em gramas (g) ...	61
TABELA 19 – Avaliação da atividade inseticida e perda da atividade de voo com os compostos em spray (n = 10).	61
TABELA 20 – Variação da massa em função da temperatura para o Linalol individualmente depois de 60 minutos.	62
TABELA 21 – Variação da massa em função da temperatura para o PN individualmente depois de 60 minutos.	63
TABELA 22 – Variação da massa em função da temperatura para o a mistura Linalol/PN depois de 60 minutos.	64
TABELA 23 – Testes de repelência com fêmeas do <i>Aedes aegypti</i> (n = 20) com as substâncias sintetizadas em laboratório.	72
TABELA 24 – Testes de repelência com fêmeas do <i>Aedes aegypti</i> (n = 20) com as substâncias sintetizadas em laboratório e os respectivos precursores.	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	- Enzima acetilcolinesterase
ATC	- Acetilcolina
CDC	- <i>Center of Disease Control</i>
CL	- Concentração letal
CL ₅₀	- Concentração letal para 50 % da população
CL ₉₀	- Concentração letal para 90 % da população
CL ₉₅	- Concentração letal para 95 % da população
CL ₉₉	- Concentração letal para 99 % da população
DEET	- N, N-dietil-3-metilbenzamida
DDT	- 1,1,1-tricloro-2,2- <i>bis</i> (<i>p</i> -clorofenil)etano
DTNB	- 5,5-Ditio-bis-ácido-2-nitro-benzóico
DMSO	- Sulfóxido de dimetila
EST – α	- Enzima esterase alfa
EST – β	- Enzima esterase beta
IR3535	- 3-(N-butilacetamido) Propanoato etila
mL	- Mililitro
mmol	- Milimol
min	- Minutos
μ L	- Microlitro
<i>m/z</i>	- Relação massa/carga
<i>n</i> -BuLi	- <i>n</i> -butillítio
ppm	- Partes por milhão
PTN	- Proteína total
®	- Marca registrada
WHO	- <i>World Health Organization</i>
δ	- Deslocamento químico

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1	CICLO DE VIDA DO <i>AEDES AEGYPTI</i>	14
1.2	INSETICIDAS NATURAIS E SINTÉTICOS	15
1.2.1	Grupos químicos	15
1.2.2	Atividade inseticida dos organoclorados.....	16
1.2.3	Atividade inseticida dos organofosforados	17
1.2.4	Piretroides.....	18
1.2.5	Atividade repelente.....	19
1.3	ESTEREOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA	21
1.4	OBJETIVOS.....	25
1.4.1	Objetivo Geral	25
1.4.2	Objetivos Específicos	25
2.	MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1	BIOENSAIOS	27
2.1.1	Criação das Larvas	27
2.1.2	Determinação da Atividade Larvicida.	28
2.2	TESTE ADULTICIDA	29
2.2.1	Testes por volatilização	29
2.2.2	Testes por contato.....	29
2.2.3	Testes com spray	30
2.3	ENSAIOS ENZIMÁTICOS	30
2.3.1	Preparação das larvas para os ensaios enzimáticos	30
2.3.2	Preparação dos mosquitos para os ensaios enzimáticos	31
2.3.3	Enzima acetilcolinesterase (AChE)	31
2.3.4	Enzima esterase alfa (EST- α)	31
2.3.5	Proteína total (PTN)	32
2.3.6	Ensaio enzimático em biorreatores	32
2.4	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA).....	33
2.5	SÍNTESE DE CANDIDATOS A REPELENTES	33
2.5.1	Modificações estruturais do citronelal.....	33
2.4.1.1	Preparação do Citronelol.....	33
2.4.1.2	Preparação do 7,11-dimetildodeca-10-en-5-ol.....	34
2.4.1.3	Preparação do 8,8-dimetoxi-2,6-dimetiloct-2-eno	35
2.4.1.4	Preparação do 3,7 dimetiloctanal	36
2.4.1.5	Preparação do Ácido citronílico	37

2.4.1.6	Preparação do N1, N3-bis(3,7-dimetiloct-6-en-1-il)etano-1,2-diamina	37
2.5.2	Modificação estrutural de terpenos.....	38
2.4.2.1	Preparação do (4 <i>S</i> ,7 <i>R</i>)-7-isopropil-4-metiloxepan-2-ona.....	38
2.4.2.2	Preparação do (3 <i>S</i> , 6 <i>R</i>)-metil 6-hidroxi-3,7-dimetiloctanoato	39
2.5.3	Procedimento geral para obtenção dos derivados (D).....	40
2.6	TESTES DE REPELÊNCIA.....	41
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.1	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DOS COMPLEXOS DE MANGANÊS	42
3.2	ENSAIOS DAS ENZIMAS ACETILCOLINESTERASE (ACHE) COM COMPLEXO DE MANGANÊS	44
3.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ADULTICIDA	46
3.3.1	Aplicação direta das substâncias na câmara de vidro	46
3.3.2	Aplicação das substâncias em papel filtro	48
3.3.3	Ensaio das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e esterase alfa (EST- α) das substâncias aplicadas em papel filtro.....	52
3.3.4	Aplicação das substâncias em spray.....	54
3.3.5	Ensaio das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e esterase alfa (EST- α) das substâncias aplicadas com spray.....	56
3.3.6	Ensaio enzimático realizado em biorreatores.....	58
3.4	TESTES PARA POTENCIALIZAR OS EFEITOS ADULTICIDAS EM SPRAY.....	60
3.5	UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) PARA AVALIAÇÃO DOS VOLÁTEIS	62
3.6	SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS CANDIDATOS A REPELENTES.....	65
3.6.1	Reações de derivatização do citronelal	65
3.6.2	Testes de repelência com aplicação das substâncias derivadas do citronelal na mão	71
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
4.1	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	76
	REFERÊNCIAS.....	77
ANEXO	84

1. INTRODUÇÃO

O *Aedes aegypti* é proveniente da África e dotado de grande capacidade de adaptação sendo o principal vetor transmissor de doenças como dengue (CARVALHO et al., 2009; GUBLER, 1998; LAMBRECHTS et al., 2010), chikungunya (REGIS et al., 2013), zika (WONG et al., 2016), como também responsável pela transmissão da febre amarela (GUBLER, 2004).

As razões para o ressurgimento global de epidemias de dengue não estão completamente compreendidas, mas estão relacionadas às mudanças demográficas e sociais, incluindo o aumento do fluxo populacional (WHO, 1997; ERNST et al., 2017; MORENO-MADRIÑÁN e TURELL, 2017). O crescimento populacional, a migração rural-urbana e a infraestrutura urbana básica inadequada, são alguns dos fatores responsáveis pelas condições que favorecem a transmissão do vírus pelo mosquito *A. aegypti* (BANGS et al., 2001; ZARA et al., 2016).

Acredita-se que 3,9 bilhões de pessoas, em 128 países, estão em risco de infecção com o vírus da dengue (BRADY et al., 2012). Além disso, estima-se que cerca de 390 milhões de pessoas são infectadas anualmente, das quais 96 milhões manifestam aparentemente qualquer nível de gravidade da doença (ARAÚJO et al., 2015). A incidência de dengue tem crescido gravemente em todo o mundo nas últimas décadas. Os números reais de casos de dengue podem estar subnotificados e muitos casos são classificados erroneamente (BHATT et al., 2013).

Desde 1994 no Brasil tem ocorrido uma rápida dispersão do vetor sobre uma grande área, o que levou a uma circulação viral em vários estados e causou um rápido aumento da extensão da doença (ARAÚJO et al., 2015). Em 2016, foram registrados 1.487.924 casos prováveis de dengue no Brasil, com região Sudeste registrando o maior número de casos (855.425 casos; 57,5%). No mesmo ano foram também relatados no país 263.598 casos prováveis de febre de Chikungunya e 211.770 casos prováveis de febre pelo vírus Zika no país (VIGILÂNCIA, 2016).

Enquanto se aguarda a disponibilidade de uma vacina eficaz ou drogas antivirais específicas contra os quatro sorotipos da dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3, e DEN-4) (CARVALHO et al., 2009; BHATT et al., 2013), chikungunya (DUPONT-ROUZEYROL et al., 2012; REGIS et al., 2013;) e zika (WONG et al., 2016), a única forma de reduzir a incidência destas doenças se restringe ao controle do vetor *A.*

aegypti (MALAVIGE et al., 2004), que frequentemente depende de aplicações de inseticidas sintéticos convencionais (BRAGA; VALLE, 2007).

Existem três estratégias principais para o controle de mosquitos *A. aegypti* (BALDACCHINO et al., 2015; ZARA et al., 2016):

- O controle mecânico que visa diminuir os potenciais criadouros do mosquito e impedindo o desenvolvimento do ciclo de vida do inseto. Esta estratégia é baseada na remoção de potenciais criadouros com água parada. O método também consiste em armadilhas para eliminar e monitorar a população do mosquito.
- O controle biológico que consiste em utilizar um inimigo natural específico, como por exemplo algumas espécies de peixes, parasitas, alguns tipos de fungos e nematoides, contribuindo para diminuir a população de larvas ou do mosquito adulto.
- O controle químico que está diretamente ligado ao uso de algum tipo de substância que inibe a eclosão de ovos, que atuam como reguladores de crescimento de larvas ou eliminam o mosquito adulto. Substâncias com ação repelente também se enquadram nesta categoria.

Há uma grande variedade de métodos de controle de vetores que incluem os mosquitos, mas com sucesso limitado, provavelmente por causa de uma fraca participação das comunidades e pela falta de coordenação e implementação por parte das autoridades de políticas a longo prazo.

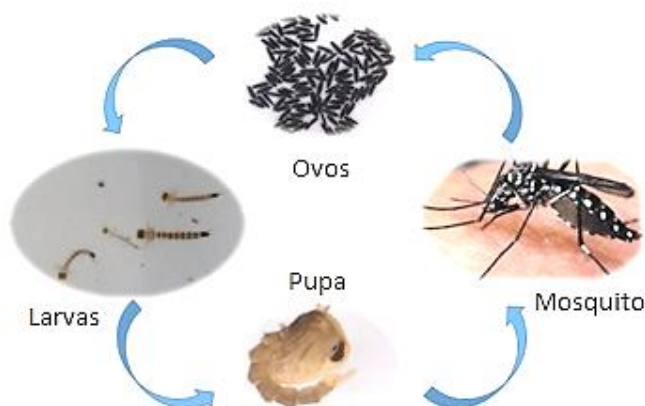
1.1 CICLO DE VIDA DO *Aedes aegypti*

A fêmea do mosquito *A. aegypti* oviposita nos mais diferentes locais, desde paredes ásperas, umedecidas e escurecidas de recipientes, mas também pode ser diretamente na água, ou ainda também sob condições laboratoriais podem ovipositar em papel sulfite, papel filtro, papel manteiga e papel toalha. Os ovos podem permanecer sem eclodir por um grande período de tempo, aguardando até ter contato com a água (DA SILVA; DA SILVA, 1999; ZARA et al., 2016).

Após a eclosão do ovo o *A. aegypti* torna-se uma larva, que passa por quatro estágios (1º a 4º instar) até se tornar pupa. Esta fase destaca-se pela inexistência de alimentação e pela metamorfose que marcará o início da fase adulta (PRUD'HOMME et al., 2017).

A fêmea do *A. aegypti* necessita de alimentação sanguínea para completar o processo de amadurecimento do folículo ovariano, e após alguns dias a fêmea já está apta a ovipositar fechando o ciclo do mosquito (ZARA et al., 2016). A Figura 1 ilustra as diversas fases do ciclo de vida do *A. aegypti*.

FIGURA 1 – Representação do ciclo de vida do *Aedes aegypti*.



1.2 INSETICIDAS NATURAIS E SINTÉTICOS

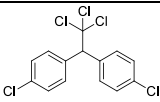
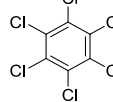
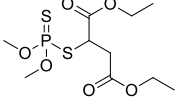
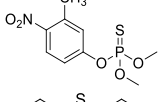
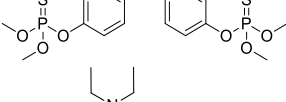
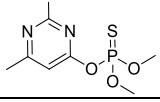
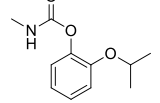
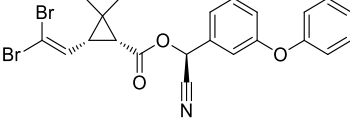
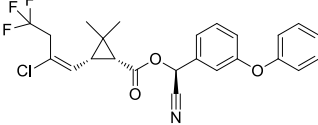
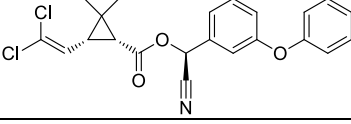
1.2.1 Grupos químicos

O uso continuado de inseticidas, tanto na agricultura e pecuária como na área da Saúde Pública, tem provocado o aparecimento de populações resistentes e ocasionado problemas para o controle de vetores (HENRIQUE; PAIVA, 2013; MALAVIGE et al., 2004). A Tabela 1 apresenta os grupos mais comuns usados no controle de vetores, entre eles o DDT e o BHC que foram amplamente utilizados, porém hoje não são mais empregados para o controle de vetores (MS/FUNASA, 2001a).

Para substituir os organoclorados foram utilizados os organofosforados como: malation, fenitrotriona e temefós. Depois foram utilizados os piretroides cipermetrina e deltametrina, devido à alta eficiência contra mosquitos adultos e por serem necessárias menores quantidades do princípio ativo, porém a desvantagem está no alto impacto ambiental e no alto custo dos piretroides. O monitoramento dos inseticidas em diferentes áreas do país é uma estratégia importante para ampliar o

conhecimento sobre os mecanismos de resistência e para o controle dos níveis de infestação (ZARA et al., 2016).

TABELA 1 – Alguns grupos químicos e substâncias representativas utilizados no controle de pragas.

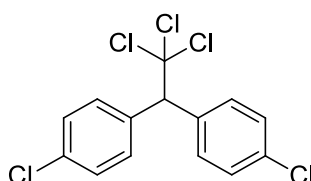
Grupo Químico	Nome Comercial	Princípio Ativo	Estrutura
Clorados	-	DDT	
	-	BHC	
Fosforados	<i>Cythion, Fyfanon, Malatol</i>	Malation	
	<i>Sumithion, Folithion</i>	Fenitrothion	
	Abate	Temefós	
	-	Pirimifos	
Carbamatos	<i>Baygon</i>	Propoxur	
Piretroides	<i>K-Othrine</i>	Deltametrina	
	<i>Icon</i>	Lambda cialotrina	
	<i>Cymperator</i>	Cipermetrina	

1.2.2 Atividade inseticida dos organoclorados

A partir de 1942, com a descoberta das propriedades inseticidas do 1,1,1-tricloro-2,2-bis-(*p*-clorofenil)etano (DDT) (Figura 2), uma grande quantidade de hidrocarbonetos clorados foi utilizada, almejando o controle de pragas. De acordo com estimativas da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos, o uso de DDT

conseguiu impedir mais de 500 milhões de mortes. Inicialmente esta prática teve sucesso, porém, com o passar dos anos, percebeu-se que substâncias cloradas sofrem degradação lenta por processos naturais (IMFELD et al., 2009). Na década de 1970 estes compostos tiveram seu uso proibido, devido à descoberta de que halogenetos de arila são solúveis em gordura e acumulam nos tecidos adiposos da maioria dos animais e se constituem em risco potencial à vida humana, com suspeita de ação carcinogênica (D'AMATO; TORRES; MALM, 2002).

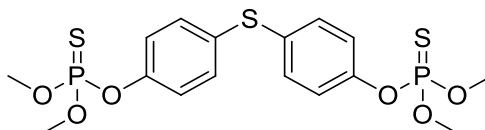
FIGURA 2 – 1,1,1-tricloro-2,2-bis(*p*-clorofenil)etano (DDT).



1.2.3 Atividade inseticida dos organofosforados

O Temefós (O, O, O', O'-tetrametil-O, O'-tiodi-*p*-fenilenofosforotioato) (Figura 3) é um pesticida organofosforado registrado nos EUA em 1965, para utilização em agricultura e controle de mosquitos e que foi amplamente utilizado no Brasil de 1967 a 1998 para o controle do *A. aegypti*. O pesticida é normalmente empregado durante o período larval, aplicado em água estagnada a uma concentração de 1% (m/v), ou em água para uso doméstico, a uma concentração final de 1 ppm (MS/FUNASA, 2001b).

FIGURA 3 – O, O, O', O'-tetrametil-O, O'-dtioi-*p*-fenilenofosforotioato (Temefós).



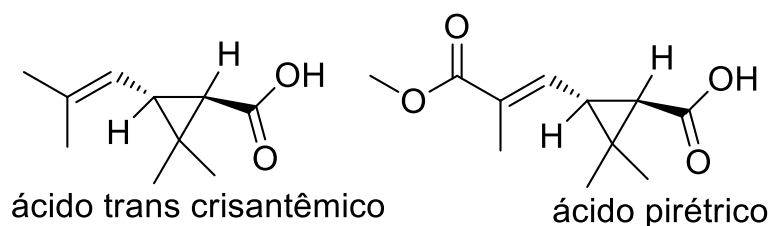
O mecanismo de ação dos organofosforados passam pela inibição da acetilcolinesterase (AChE), uma importante enzima do sistema nervoso central. Essa enzima é fosforilada pelo inseticida, ficando irreversivelmente inativada. A inibição da AChE resulta no acúmulo de acetilcolina impedindo a interrupção da propagação do impulso elétrico. Consequentemente, o sistema nervoso central continuará sendo

estimulado, desencadeando o processo de paralisia que pode culminar com a morte do inseto (MONTELLA; SCHAMA; VALLE, 2012).

1.2.4 Piretroides

As piretrinas são encontradas em algumas plantas e são vitais para a sua sobrevivência, podendo inibir o ataque de pragas predadoras. Apesar de muitas moléculas derivadas de plantas com estas características terem sido identificadas, apenas as piretrinas, que são obtidas a partir dos extratos da planta *Chrysanthemum cinerariaefolium* pertencente à família das Asteraceae, estão disponíveis para uso comercial (HIRATA, 1995). As piretrinas são ésteres dos ácidos crisantêmico e pirétrico (Figura 4) (RODRIGUES, 2010).

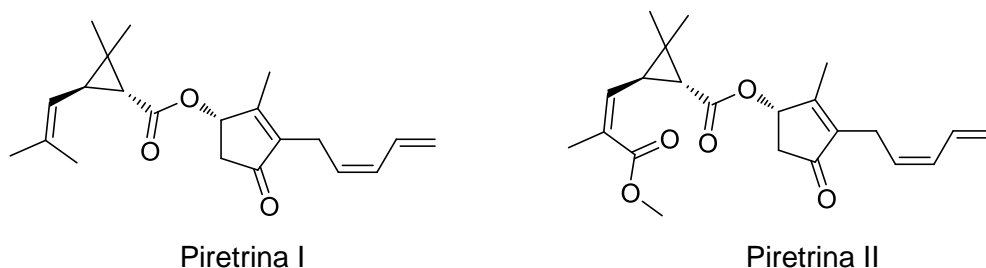
FIGURA 4 – Estruturas dos ácidos crisantêmico e pirétrico.



A descoberta e a evolução da classe dos inseticidas classificados como piretroides, derivados das piretrinas naturais, vem seguindo uma sequência clássica que consiste na observação da atividade num extrato natural, isoladamente seguido da identificação dos compostos de análogos mais ativos (CUNH, 1989; ELLIOTT, 1979).

A atividade inseticida pode-se manifestar de maneiras diferentes, como ocorre nas piretrinas, onde a piretrina II (Figura 5) é responsável pelo “knockdown” (queda do inseto sem matá-lo), enquanto a piretrina I (Figura 5) é a que causa a morte do inseto (BRIGGS et al., 1976; SAWICKI, 1962).

FIGURA 5 – Estrutura piretrina.



Segundo Barlow e colaboradores (1971), as exigências estruturais para provocar o “*knockdown*”, podem ser diferentes das que causam a morte. Variações na rapidez da paralisia temporária apresentadas por vários piretroides foram associadas com a diferença nas suas velocidades de penetração e destoxificação. A mudança do grupo metila para éster metílico, da piretrina I para piretrina II, provoca um aumento na polaridade da molécula, o que certamente afetará a velocidade de penetração, isto explica a ação de “*knockdown*” apresentada pela piretrina II (BRIGGS et al., 1974). Os efeitos mais prolongados, que matam os insetos, estariam relacionados com a maior lipofilia da piretrina I (BRIGGS et al., 1976).

Devido aos problemas acarretados com o uso excessivos dos inseticidas em geral organoclorados e organofosforados, começou-se a vislumbrar a possibilidade de controle alternativos de pragas através do seu manejo integrado (MIP).

O MIP é o sistema que associa o ambiente e a dinâmica populacional da espécie, utiliza alternativas apropriadas e métodos de forma tão compatível quanto possível para manter a população da praga em níveis abaixo daqueles capazes de causar danos econômicos. A importância da biologia e da ecologia não está associada só na espécie-alvo, mas também nos inimigos naturais e nos diferentes meios do ecossistema (WAQUIL, 2002).

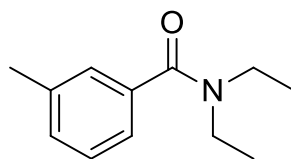
Como parte destas estratégias, destaca-se o uso de óleos essenciais, que são produtos geralmente pouco tóxicos e que podem atuar somente alterando o comportamento dos organismos alvos (PAVELA, 2015).

Poucas pesquisas têm sido desenvolvidas sobre o efeito de fitoquímicos em mosquitos adultos. A bioatividade de fitoquímicos contra o mosquito pode variar significativamente dependendo da espécies de plantas (SHAALAN et al., 2005). Os resultados de um estudo com extratos de plantas sugerem que a ação adulticida é um campo de pesquisa com grande potencial e ainda pouco explorado.

1.2.5 Atividade repelente

Durante muitos anos o repelente sintético mais conhecido e utilizado foi o N, N-dietil-3-metilbenzamida (DEET) (Figura 6). Esta substância tem eficácia comprovada para mosquitos e é usada em formulações comerciais em concentrações que variam de 30 % a 70 % do ativo (m/m), mais usualmente empregada na faixa de 20 % a 25 %. Embora esteja disponível comercialmente há mais de 60 anos, o DEET pode causar efeitos tóxicos, principalmente em crianças e gestantes (OLIVEIRA, 2008).

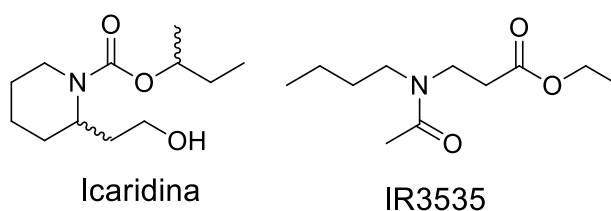
FIGURA 6 – Estrutura da N, N-dietil-3-metilbenzamida (DEET).



Devido a sua persistência no efeito de repelência, estima-se que cerca de 200 milhões de pessoas utilizem o DEET no mundo (MAIA; MOORE, 2011). No entanto, ele apresentou alguns efeitos adversos, tais como toxicidade dérmica, convulsões e psicose maníaca aguda (NUCHUCHUA et al., 2009), e também a ocorrência de casos de encefalite associados ao seu uso (PAULA et al., 2004).

Além do DEET, outros repelentes de origem sintética têm sido empregados, os mais comuns são a Icaridina e o IR3535 (Figura 7).

FIGURA 7 – Estrutura da Icaridina e do IR3535.

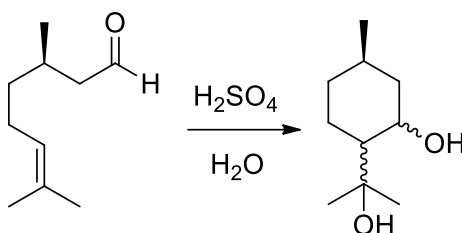


Estudos têm sido realizados para identificar novas substâncias que possam ser utilizadas como agentes repelentes (REHMAN; ALI; KHAN, 2014). Entretanto, as principais barreiras no desenvolvimento de novos repelentes estão diretamente ligadas ao custo estimado para síntese e viabilidade das análises de segurança dos novos compostos (KAIN et al., 2013). Um desafio significativo para encontrar substitutos do DEET está associado ao desconhecimento dos receptores alvo através dos quais repele os insetos. Um estudo recente baseado na interação entre essas substâncias repelentes com receptores presentes no *A. aegypti* levou à proposição de novas moléculas com ação repelente. (KAIN et al., 2013).

Os efeitos de repelência de substâncias naturais normalmente não perduram por períodos próximos ao do DEET. No entanto, efeitos de proteção prolongada são descritos na literatura a partir do uso de 20 % (m/m) do óleo de citronela, de açafrão, e de manjerição cabeludo, especialmente com a adição de vanilina 5% como fixador, em que cada um pode repelir três espécies de mosquitos por até 6 h (NUCHUCHUA et al., 2009; WALIWITIYA et al., 2005; TAWATSIN et al., 2001).

A substância de origem natural com o maior tempo de repelência é o *p*-mentano-3,8-diol, isolado como componente majoritário no óleo essencial de *Eucalypto citriodora* (DIAZ, 2016; DRAPEAU et al., 2011) e a preparação de isômeros de PMD a partir do citrôn timer, contidos no óleo de *E. citriodora*, envolve a presença de um meio ácido como mostrado no esquema 1 (DRAPEAU et al., 2011).

ESQUEMA 1 – Síntese do *p*-mentano-3,8-diol a partir do (R)-citrôn timer.



1.3 ESTEREOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA

Os seres vivos são formados, em grande maioria, por substâncias orgânicas quirais de baixa massa molecular, e por macromoléculas constituídas de monômeros quirais. Como consequência de sua estrutura molecular quiral, os seres vivos são capazes de diferenciar estereoisômeros, chegando ao nível de diferenciação de pares de enantiômeros (BARREIRO, 1997).

Um receptor biológico pode interagir com uma molécula emitindo uma mensagem para algum alvo no organismo. Moléculas diferentes vão emitir sinais diferentes, quando se tem centros estereogênicos este sinal resultará em alterações no organismo e muito desses sinais serão desencadeados pela interação diferenciada que ocorre com enantiômeros (KIESSWETTER, 2007).

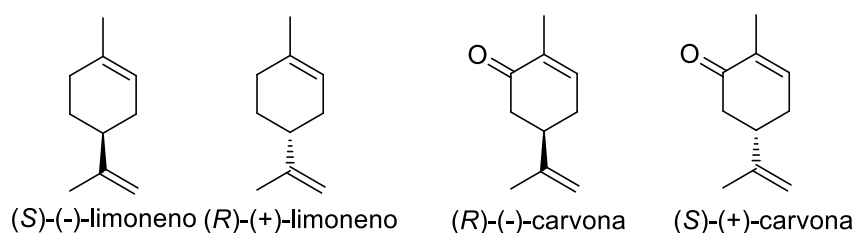
Devido a importância das relações espaciais tridimensionais estabelecidas entre moléculas de baixa massa molecular (por exemplo, uma droga) e seu local de ação (sítio ativo), é necessário testar enantiômeros individualmente e não somente a mistura das duas formas. Tendo em vista a grande dificuldade de separar enantiômeros, é importante controlar a formação de um dos isômeros durante a síntese de um composto com estereocentro definido (STYMIEST et al., 2008).

Uma vez que as atividades dos enantiômeros são geralmente diferentes, o efeito biológico da sua mistura racêmica pode ser desigual às atividades dos dois

enantiômeros separados. A quantidade de material necessária para que uma determinada ação se manifeste, no caso de um enantiômero, pode ser inferior à quantidade necessária do racemato, o que pode ser vantajoso para o organismo e para o ambiente, particularmente no caso de pesticidas (IGNAZ J. BUERGE et al., 2003). A utilização de misturas enantiomericamente enriquecidas tem aumentado de forma constante em função dos estudos que mostram ações diferenciadas dos enantiômeros e do racemato (KIESSWETTER, 2007).

Como exemplo pode-se citar os monoterpenos quirais que geralmente são produzidos na forma de ambos os enantiômeros, muitas vezes pela mesma espécie vegetal. Estes monoterpenos enantioméricos podem exibir atividades biológicas diferentes, como por exemplo o limoneno e a carvona que são monoterpenos cíclicos que apresentam bioatividade distintas, em ambos os casos essas substâncias são facilmente diferenciadas pelos receptores olfativos dos seres humanos. Talvez o exemplo mais conhecido seja o caso do (+)-limoneno que tem o cheiro de laranja, enquanto o enantiômero (-) tem cheiro de limão. Já a (+)-carvona tem cheiro de cominho, enquanto o seu enantiômero produz um odor de hortelã (Figura 8) (FINEFIELD et al., 2012).

FIGURA 8 – Estereoisômeros do limoneno e da carvona.

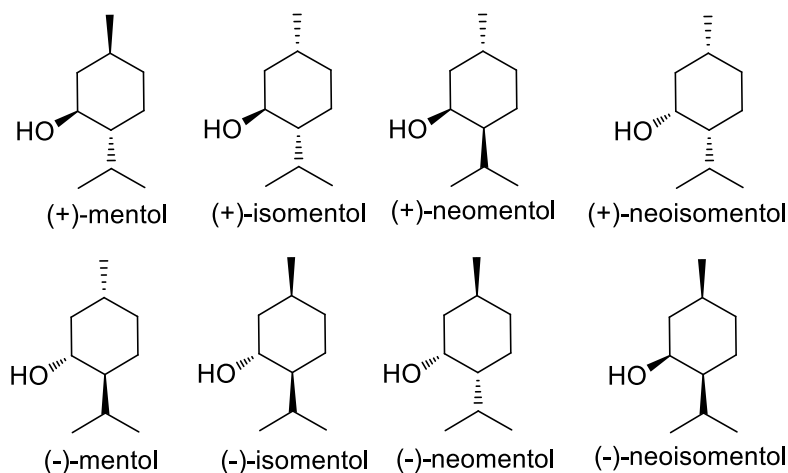


A configuração de uma molécula influencia a atividade biológica e a seletividade das respostas dos insetos ao produto natural e aos produtos químicos sintéticos. Os estereoisômeros menos ativos nas misturas podem diminuir a atividade dos isômeros mais ativos, e os isômeros individuais podem ter propriedades biológicas diferentes (KLUN, 2001).

O mentol é um composto natural com três estereocentros e ocorre como quatro pares de isômeros opticamente ativos ou seja (+) e (-)-mentol, (+) e (-)-isomentol, (+) e (-)-neomentol, (+) e (-)-neoisomentol (Figura 9). A forma principal de mentol encontrado na natureza é (-)-mentol, com as seguintes configurações (1*R*, 2*S*,

5*R*). Esta forma é comumente utilizada porque possui propriedades refrescantes e anestésicas maiores do que os outros isômeros do mentol (KAMATOU et al., 2013).

FIGURA 9 – Estruturas dos isômeros do mentol: (+) e (-)-mentol, (+) e (-)-isomentol, (+) e (-)-neomentol, (+) e (-)-neoisomentol.



Fonte: (KAMATOU et al., 2013)

Alguns estudos mostraram que a estereoquímica de um composto pode ter um efeito na sua atividade biológica. As relações estruturais do mentol foram investigadas por Galeotti 2002, que destacou as propriedades analgésicas do (+) e (-)-mentol em camundongos albinos. O (-)-mentol foi capaz de amplificar o limiar da dor, enquanto o (+)-mentol não apresentou efeito analgésico (GALEOTTI et al., 2002).

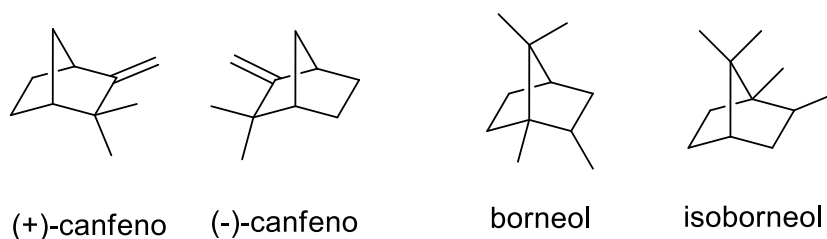
Segundo Dambolena 2010, cinco estereoisômeros de mentol foram investigados para a atividade antifúngica contra *Fusarium verticillioides*. O (+)-mentol e (-)-mentol foram os mais ativos com um valor de 1,50 mM, seguido por (+)-neomentol a 2,00 mM (DAMBOLENA et al., 2010).

A quiralidade dos componentes desempenha um papel essencial na organização e nas funções biológicas da membrana celular. Foi demonstrado que pequenas diferenças estruturais em alguns compostos químicos são suficientes para alterar as características físicas ou químicas e, portanto, modificar a atividade antifúngica (CECILIA BOMBELLI et al., 2008).

Um outro exemplo foi descrito por Santos 2010, onde foram testados 21 compostos, incluindo monoterpenos quirais, para avaliar a atividade larvídica contra *A. aegypti*. O (+)-canfeno e o (-)-canfeno (Figura 10), apresentaram $CL_{50} = 406$ e 220 ppm, respectivamente, tendo sido constatado diferença de duas vezes entre a

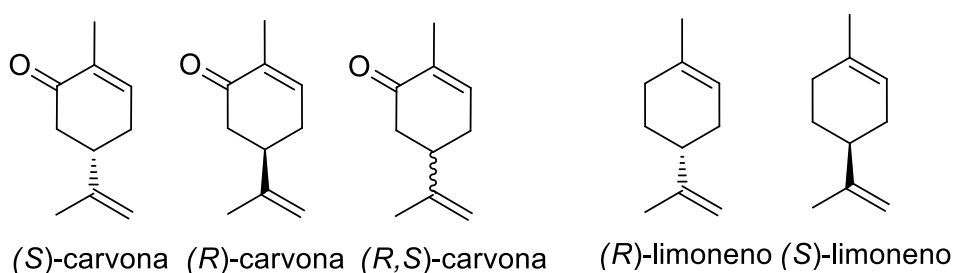
atividade dos enantiômeros. Já o borneol apresentou $CL_{50} = 610$ ppm em quanto o seu diastereoisômeros o isoborneol $CL_{50} = 598$ ppm (Figura 10), exibiram perfis semelhantes, os autores concluíram que a estereoquímica dos compostos selecionados desempenha um papel importante na atividade biológica (SANTOS, 2010).

FIGURA 10 – Estruturas do (+)-canfeno e (-)-canfeno e do borneol e isoborneol.



Em outro estudo Santos 2011, testou os compostos listados na Figura 4 quanto às suas atividades larvicidas contra *A. aegypti*. Os valores de atividade larvicida dos enantiômeros (*R*)-carvona e (*S*)-carvona foram significativamente diferentes, $CL_{50} = 152$ ppm e 124 ppm sendo que a mistura racêmica exibiu uma potência mais elevada do que os enantiômeros individuais $CL_{50} = 118$ ppm. Em contraste, as atividades larvicidas de (*R*)-limoneno e (*S*)-limoneno foram semelhantes $CL_{50} = 27$ ppm e 30 ppm, respectivamente (Figura 11).

FIGURA 11 – Estruturas dos enantiômeros (*R*) e (*S*)-carvona e do (*R*) e (*S*)-limoneno.



1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo Geral

Desenvolver metodologias de controle do mosquito *Aedes aegypti*, baseadas em substâncias naturais e ou sintéticas com ação larvicida, adulticida e repelente.

1.4.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho são:

- a) Determinar a atividade larvicida frente a imaturos de *A. aegypti*, de complexos de manganês sintetizados na UFSCar;
- b) Investigar o mecanismo de ação do complexo de manganês com melhor atividade frente às larvas do *A. aegypti*;
- c) Determinar a atividade adulticida e avaliar a existência de efeito aditivo e ou sinérgico de compostos com atividades previamente estabelecidas;
- d) Investigar o mecanismo de ação dos compostos, com melhor atividade adulticidas, frente aos mosquitos *A. aegypti*;
- e) Sintetizar e determinar as atividades repelentes de substâncias derivadas do citronelal e de outros produtos naturais com reconhecido efeito repelente e de baixa toxicidade.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os bioensaios das substâncias com atividades larvícida, adúltica ou repelente sobre o mosquito *A. aegypti* foram realizados no do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária (LEMV), Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), colaboração com o Prof. Dr. Mario Antonio Navarro da Silva. A preparação e caracterização das substâncias com atividade repelente foi realizada no Laboratório de Ecologia Química e Sínteses de Produtos Naturais (LECOSIN), Setor de Ciências Exatas da UFPR. E os complexos de manganês, substâncias com atividade larvícida, foram sintetizadas do Departamento de Química da UFSCar, no grupo coordenado pela Profa. Dra. Rose Maria Carlos.

Os seguintes produtos químicos utilizados para o bioensaios e para as sínteses foram adquiridos na Sigma-Aldrich® (Brasil): Linalol 97%, Estragol 98%, Propionato de Etila, 2,3 Butanodiona 97%, Eucaliptol 99%, Benzoato de benzila 85%, Metanoato de etila 97%, 1-Butanal 96 %, 1-Pentanal 97%, 1-Hexanol 98%, Salicilato de metila 95%, Tetrahidrolinalol 98%, Isoeugenol 97%, Geraniol 96%, Citral 95%, (*R*)-Citronelal $[\alpha]^{25}_D +15,5^\circ$, (+)-Mentona 96% $[\alpha]^{25}_D +25^\circ$, (*R*)-carvona 98% $[\alpha]^{25}_D -61^\circ$, (*R*)-(+)-cânfora 97% $[\alpha]^{25}_D +44,1^\circ$. Acros®: Limoneno 97%.

As técnicas empregadas no desenvolvimento dos trabalhos experimentais foram baseadas na literatura especializada e adaptadas, quando necessário, para obtenção de melhores resultados.

Todas as reações foram monitoradas via cromatografia em fase gasosa (CG), e/ou via cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando placas Alugram® Xtra Sil G/UV₂₅₄, através de comparação com padrões das substâncias estudadas.

As purificações foram realizadas via cromatografia em coluna de vidro, preenchida com sílica flash 60* (220-400 mesh) da ASTM Merck®. O diâmetro interno e a altura das colunas variaram de acordo com a quantidade de material a ser purificado. As eluições foram realizadas em solventes orgânicos combinados e as frações coletadas foram evaporadas sob pressão reduzida, em evaporador rotativo.

As análises de espectrometria de massas foram realizadas em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas Shimadzu® CG-EM-QP (2010 Plus) equipado com coluna capilar Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Injetor em modo split a 250 °C, interface e fonte de íons a 300 °C. A janela de massas analisada foi

entre m/z 40 e m/z 350, utilizando Hélio (He) como gás de arraste. Rampa de injeção para análise com temperatura do injetor em 250 °C, pressão da coluna de 59 quilopascal (KPa), iniciando-se com temperatura de 60 °C por 5 minutos elevando-se para 250 °C a uma razão de 8 °C/min.

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrômetro Excalibur Series - BIO-RAD FTS 3500 GX, em pastilha de brometo de potássio (KBr).

As análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono 13 foram efetuadas em um equipamento AVANCE 400 BRUKER®, quando necessário em um equipamento AVANCE 200 BRUKER® utilizando-se clorofórmio deuterado ($CDCl_3$) como solvente. Os deslocamentos químicos (δ) estão reportados em partes por milhão (ppm) em relação ao sinal do Tetrametilsilano (TMS) como referência interna. A multiplicidade dos sinais está reportada como: s – singlete; d – dublete, t – tripleto, m – multiplete. Constantes de acoplamento (J) estão reportadas em hertz (Hz) e foram calculadas utilizando o *software* MestReNova versão 6.1.0-6267.

2.1 BIOENSAIOS

2.1.1 Criação das Larvas

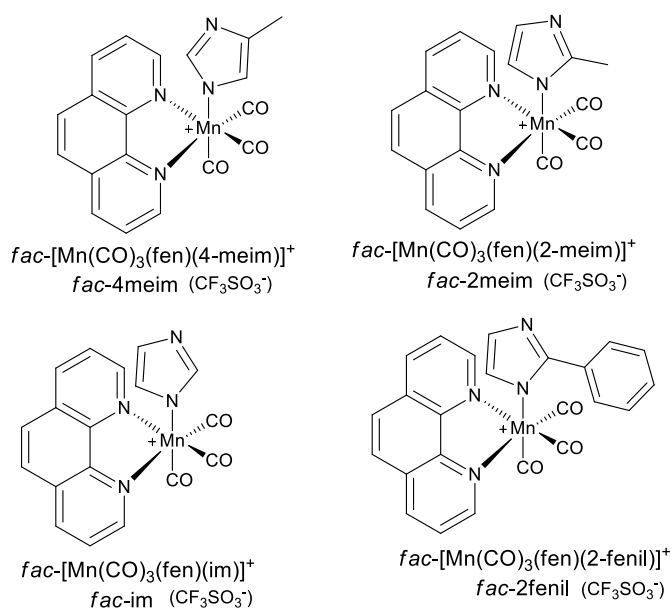
Os bioensaios foram realizados com larvas de *A. aegypti* obtidas a partir de ovos da colônia “Rockefeller-CDC” (Center of Disease Control) previamente estabelecidas no insetário do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária (LEMV).

Os ovos foram submersos em copos plásticos com capacidade para 770 mL preenchidos com água desclorada aos quais foi adicionado 26 mg de ração triturada a fim de induzir a eclosão de larvas. Obtida a eclosão larval, mediante visualização das larvas, e passadas 24 horas, estas foram transferidas para bandejas plásticas (35,5 cm x 21,5 cm x 6,5 cm) contendo 3 L de água, também desclorada. Estas larvas foram mantidas sob condições de temperatura ($25\text{ °C} \pm 1$), umidade ($70\% \pm 10$) e foto período (12:12) controlados em câmara climatizada Modelo 347 CDG e assim permaneceram até atingirem o estágio de 3º instar final ou 4º inicial.

2.1.2 Determinação da Atividade Larvícida.

Foram utilizadas 20 larvas para cada tratamento submersas em 20 mL de água desclorada em copos plásticos descartáveis com capacidade para 330 mL. Após a colocação das larvas foram adicionadas soluções aquosas de quatro diferentes complexos de manganês: $fac-[Mn(CO)_3(fen)(4-meim)]^+$ (*fac-4meim*), $fac-[Mn(CO)_3(fen)(im)]^+$ (*fac-im*), $fac-[Mn(CO)_3(fen)(2-meim)]^+$ (*fac-2meim*) e $fac-[Mn(CO)_3(fen)(2-fenil)]^+$ (*fac-2fenil*) sendo que: fenantrolina (fen), 4-metil-imidazol (4-meim), imidazol (im) 2-metil-imidazol (2-meim) e 2-fenil-imidazol (2-fenil) (FIGURA 12). Foram utilizadas cinco concentrações de cada complexo $30 \mu\text{mol L}^{-1}$, $40 \mu\text{mol L}^{-1}$, $70 \mu\text{mol L}^{-1}$, $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, $150 \mu\text{mol L}^{-1}$. O volume final de cada tratamento foi de 100 mL.

FIGURA 12 – Estruturas dos quatro diferente complexos de manganês.



FONTE: o autor (2017).

Para os grupos controle, 20 larvas foram expostas a uma solução aquosa de sulfóxido de dimetila (1 mL para 99 mL de água destilada), e outro grupo foi exposto apenas à água destilada. Todos os ensaios foram realizados em quadruplicata, mantidos sob as mesmas condições de temperatura, foto período e suprimento de alimento.

A mortalidade das larvas foi verificada a cada 24 horas, no controle e no tratamento até a mortalidade total das larvas de cada tratamento. As larvas incapazes

de atingir a superfície da água ou imóveis quando submetidas a estímulos, batidas sucessivas na parede dos copos com pipeta de Pasteur, foram consideradas como larvas mortas. As larvas mortas foram descartadas a cada leitura de 24 horas. Ao final do experimento as larvas sobreviventes foram descartadas.

O bioensaio teve duração de 96 horas (4 dias), com adição de ração e com reposição de água em caso de evaporação para manter sempre o volume final de 100 mL.

2.2 TESTE ADULTICIDA

Os testes de ação adulticida foram realizados no Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária, a uma temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de 60 a 70 %. Os dados de temperatura e umidade relativa, dentro da sala de criação e gaiola, foram monitorados e registrados utilizando um termo higrômetro digital durante os experimentos. Para os testes fêmeas do mosquito *A. aegypti* foram utilizadas seguindo as recomendações da Organização mundial da saúde (WHO, 2006).

2.2.1 Testes por volatilização

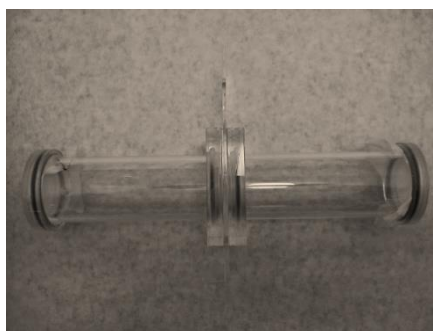
Para os testes de aplicação direta do composto foram utilizadas câmaras de vidro, de 130 mm de comprimento e 45 mm de diâmetro e para fechar as extremidades foram utilizados pedaços de tecido “voil” e elásticos, com 10 fêmeas do mosquito *A. aegypti*. Os compostos de interesse foram aplicados com o auxílio de pipetas automáticas de forma direta em uma das extremidades da câmara. As câmaras de vidro foram armazenadas em ambiente climatizados e a avaliação da mortalidade foi feita até 24 horas após a aplicação.

2.2.2 Testes por contato

Para a realização de testes de contato foram utilizados dois tubos de plástico, de 125 mm de comprimento e 44 mm de diâmetro (Figura 13). Um tubo é para a exposição do material e outro tubo para retenção dos mosquitos. As duas partes dos tubos são conectas e separadas através de uma porta de plástico que corre verticalmente, permitindo que os mosquitos sejam transferidos da unidade de retenção para a unidade de exposição. Depois de expostos ao tratamento por 1 hora, os mosquitos voltam para a parte de retenção onde são efetuadas as leituras de

mortalidade. Para os testes foram utilizadas 10 fêmeas do mosquito *A. aegypti* e as substâncias de interesse foram diluídas em 1 mL de etanol absoluto. Esta solução foi então espalhada na superfície de um papel filtro, com o auxílio de uma pipeta, impregnando todo o papel de forma mais homogênea possível. Deixou-se secar o papel o qual foi inserido no tubo de exposição.

FIGURA 13 – Tubos utilizados durante os testes por contato



FONTE: o autor (2017).

2.2.3 Testes com spray

Durante os testes de ação adulticida foram utilizadas gaiolas de madeira com telas nas laterais e vidro na face superior, medindo 30 cm x 30 cm x 30 cm, com 20 fêmeas do mosquito *A. aegypti*. Um spray com a combinação dos compostos foi aplicado por um dos lados da gaiola. O tempo de aplicação do spray foi controlado de forma manual, variando entre 2 a 3 segundos. As gaiolas foram armazenadas em ambiente climatizados e a avaliação da mortalidade foi feita até 24 horas após a aplicação.

2.3 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

2.3.1 Preparação das larvas para os ensaios enzimáticos

As larvas provenientes dos bioensaios de toxicidade aguda e crônica de 72 e 96 horas foram colocadas, ainda vivas, em tubos tipo *Eppendorf*. Estas foram congeladas imediatamente em freezer a -20°C e estocadas em freezer a -80°C. No momento da utilização, os tubos foram retirados do congelador para o processamento imediatamente antes do uso e foram descongeladas lentamente.

Para a homogeneização do material, as larvas foram distribuídas individualmente em tubos tipo *Eppendorf* previamente identificados, seguido da adição

de 300 µL de solução tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,5 para a enzima AChE. As larvas foram então homogeneizadas com o auxílio de um homogeneizador 3000 rpm. Em seguida os conteúdos dos frascos foram centrifugados por 1 minuto a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos.

2.3.2 Preparação dos mosquitos para os ensaios enzimáticos

As fêmeas do mosquito provenientes dos bioensaios de toxicidade aguda e crônica foram colocadas, ainda vivas, em tubos tipo *Eppendorf*. Estas foram congeladas imediatamente em freezer a -20°C e estocadas em freezer a -80°C. No momento da utilização, os tubos foram retirados do congelador para o processamento imediatamente antes do uso e foram descongeladas lentamente.

Para a homogeneização do material, os mosquitos foram distribuídos individualmente em tubos tipo *Eppendorf* previamente identificados seguido da adição de 300 µL de solução tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,5 para a enzima AChE e 150 µL de solução tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,2 para as enzimas EST- α . Os mosquitos foram então homogeneizados com o auxílio de um homogeneizador 3000 rpm. Em seguida os conteúdos dos frascos foram centrifugados por 1 minuto a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

2.3.3 Enzima acetilcolinesterase (AChE)

Uma alíquota de 25 µL da amostra preparada no item 2.3.2 foi pipetada em quatro réplicas em microplaca (96 poços, transparentes, com fundo chato) seguidos da adição de 200 µL de ácido 5,5-ditio-*bis*-2-nitrobenzóico (DTNB) (reagente de Ellman) e 50 µL de iodeto de acetilticolina (ATC). O material foi incubado por 5 min.

A leitura foi feita em espectrofotômetro de microplaca *BioTek* com comprimento de onda de 405 nm, referente ao ânion tiolato, de acordo com o método de (ELLMAN et al., 1961) modificado para microplaca (SILVA DE ASSIS, 1998).

2.3.4 Enzima esterase alfa (EST- α)

Uma alíquota de 10 µL de amostra 2.3.2 foi pipetada em quatro réplicas em microplacas (96 poços, transparentes, com fundo chato), seguido da adição de 200 µL de α -naftil acetato. Esperou-se 15 minutos em temperatura ambiente, logo após adicionou-se 50 µL do corante *Fast blue (o-Dianisidine bis(diazotized) zinc double salt*,

Naphthanil Diazo Blue B), esperou mais cinco minutos e a leitura foi feita a 570 nm em espectrofotômetro de microplaca *BioTek* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

2.3.5 Proteína total (PTN)

A quantidade de proteína total foi mensurada para cada larva de acordo com o método descrito por (BRADFORD, 1976). Esta quantificação é necessária, pois os resultados de todas as enzimas são normalizados de acordo com a quantidade de proteínas presentes em cada larva testada.

Uma alíquota de 10 μL de amostra foi pipetada em quatro réplicas em microplaca, seguido pela adição de 250 μL do reativo Bradford (*Bio-Rad*) diluído em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,5 na proporção de 1:5. A leitura foi realizada, três a cinco minutos após a adição do reativo, à 620 nm em espectrofotômetro de microplaca *BioTek* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

2.3.6 Ensaios enzimáticos em biorreatores

Os ensaios em biorreatores foram realizados pelo Grupo de Cromatografia de Bioafinidade e Produtos Naturais do Departamento de Química-Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Este trabalho foi realizado em colaboração com a Profa. Dra. Carmen Lucia Cardoso.

Os biorreatores para investigação da atividade enzimática anticolinesterásico foram previamente preparados conforme a metodologia descrita por (DA SILVA et al., 2013 e VILELA et al., 2014).

Os biorreatores denominados ICER de 30 cm x 0,01 mm em capilar de sílica fundida foram preparados pela imobilização de 3 enzimas colinesterases diferentes acetilcolinesterase de enguia elétrica (ICER-AChE-ee), acetilcolinesterase de eritrócitos humanos (ICER-AChE-hu) e butirilcolinesterase de soro humano (ICER-BChE-hu). Os ICER foram utilizados como colunas conectadas ao HPLC.

As amostras de interesse foram preparadas na concentração de 1 mmol L⁻¹ e solubilizadas em etanol absoluto.

A partir da diluição das soluções estoque dos compostos (1,0 mmol L⁻¹) foram preparadas soluções de 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para cada composto: 60 μL da solução de tampão trabalho, 20 μL da solução do composto, e 20 μL da solução de ATChI (AChE) ou 20 μL da solução de BTChI (BChE). O volume final foi de 100 μL . As soluções foram preparadas em duplicatas e alíquotas de 10 μL foram injetadas.

Antes de cada amostra foi injetado apenas o substrato da enzima para a avaliação da atividade enzimática que consistiu em: 60 μL da solução de tampão trabalho, 20 μL da solução de ATChI (AChE) ou BTChI (BChE) e 20 μL de etanol.

Também foi injetado um branco de cada composto que consistiu em: 60 μL da solução de tampão trabalho, 20 μL da solução do composto e 20 μL de etanol.

As condições de análise foram:

Fase móvel (Tampão de trabalho): Tampão Tris (tris(hidroximetil)aminometano) 0,100 mol L⁻¹ pH 8,0 e reagente de Ellman (DTNB - ácido 5,5-ditiobis[2-nitrobenzóico]) 0,126 mmol L⁻¹;

Amostra injetada: 10 μL da solução contendo 1 mmol L⁻¹ de Acetilcolina (ATChI) para AChE e 50,0 mmol L⁻¹ de Butirilcolina (BTChI) e 200 μmol L⁻¹ do composto a ser testado;

Vazão: 0,05 mL/min;

Detector DAD-UV: 412 nm;

Inibidor padrão utilizado: Tacrina para AChE e eserina para BChE;

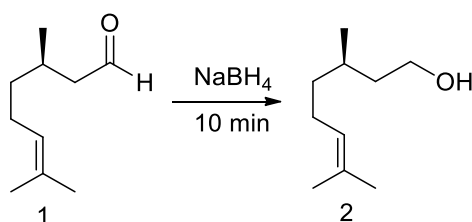
2.4 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

As análises termogravimétricas foram realizadas em um equipamento da Netzsch modelo TG 209, num intervalo de tempo de 60 minutos com temperaturas constante de 20 °C, 30°C 3 40°C, em atmosfera oxidante.

2.5 SÍNTESE DE CANDIDATOS A REPELENTES

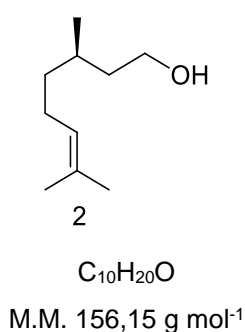
2.5.1 Modificações estruturais do citronelal

2.4.1.1 Preparação do Citronelol



Foi adicionado a um almofariz o citronelal (1,0 g, 6 mmol) e posteriormente o borohidreto de sódio (0,250 g, 6 mmol). Com o auxílio de um pistilo os reagentes foram macerados por 10 minutos. Depois o almofariz foi lavado com éter etílico e o conteúdo foi transferido para um funil de separação. A fase orgânica foi lavada com solução saturada de bicarbonato de sódio (5 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório. O produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna utilizando como fase móvel hexano: acetato de etila (8: 2), obtendo-se 0,75 g (74 %) do álcool (CHO et al., 2006).

Dados espectrais:

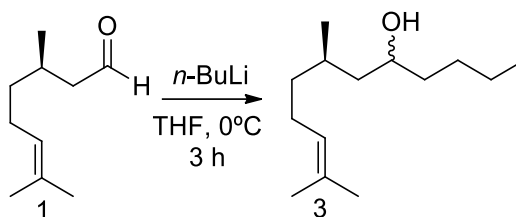


E.M. *m/z* (abundância relativa %): 156 (3); 138 (13); 123 (23); 109 (17); 95 (47); 83 (13); 82 (50); 81 (59); 71 (27); 70 (17); 69 (100); 68 (28); 67 (62); 56(30); 55 (60); 43 (20); 41 (95).

RMN de ¹H (400 MHz - CDCl₃) δ (ppm): 0,92 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H); 1,20 (m, 2H) 1,35 (m, 2H) 1,42 (m, 1H) 1,60 (m, 1H) 1,62 (s, 3H) 1,70 (s, 3H) 2,00 (m, 2H) 3,69 (m, 2H) 5,12 (m, 1H).

RMN de ¹³C (100 MHz CDCl₃) δ (ppm): 17,6; 19,5; 25,4; 25,7; 29,2; 37,2; 39,9; 65,2; 124,7; 131,2.

2.4.1.2 Preparação do 7,11-dimetildodeca-10-en-5-ol



Em um balão de 50 mL, adaptado com barra magnética para agitação, contendo uma solução de *n*-butil lítio em hexano (5,9 mL, 14 mmol) e THF (25 mL), a 0°C, adicionou-se lentamente uma solução de citronelal (1,85 g, 12 mmol) em THF (10 mL). O conteúdo do balão reacional foi agitado à temperatura ambiente por 3 horas e então foi adicionado solução saturada de cloreto de amônio (5 mL). O produto da reação foi extraído com éter etílico (3 x 30 mL). As fases orgânicas foram unidas e seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório. O produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna utilizando como fase móvel hexano/acetato de etila (8: 2), obtendo-se 1,30 g (51%) do material (TAKAHASHI, 1999).

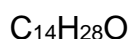
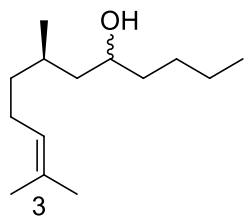
Dados espectrais

E.M. m/z (abundância relativa %): 212 (1); 155 (6); 137 (9); 127 (64); 109 (58); 96 (23); 95 (55); 82 (100); 81 (83); 69 (88); 67 (47); 55 (37); 41 (68).

IV (cm^{-1}): 735, 825, 841, 901, 1026, 1051, 1121, 1377, 1454, 1643, 2729, 2860, 2928, 2959, 3377.

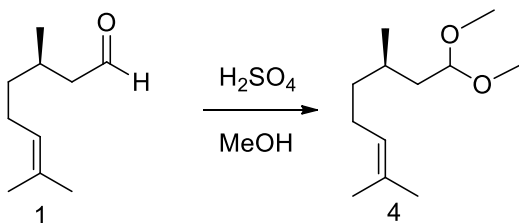
RMN de ^1H (400 MHz - CDCl_3) δ (ppm): 0,92 (t, $J = 6,6$ Hz, 3H); 0,96 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H); 1,2 (m, 2H) 1,3 (m, 5H) 1,4 (m, 5 H); 1,63 (s, 3H) 1,7 (s, 3H) 2,0 (m, 2H) 3,7 (1H) 5,1 (m, 1H).

RMN de ^{13}C (100 MHz CDCl_3) δ (ppm): 14,0; 17,6; 19,2; 20,3; 22,7; 25,4; 25,5; 25,7; 27,7; 27,9; 28,9; 29,3; 36,7; 37,5; 37,9; 38,1; 44,9; 45,1; 69,6; 70,0; 124,8; 131,1; 131,2.

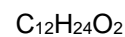
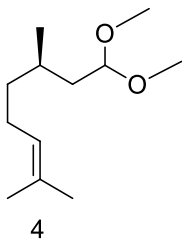


M.M. 212,21 g mol^{-1}

2.4.1.3 Preparação do 8,8-dimetoxi-2,6-dimetiloct-2-eno



Em um balão de 25 mL, adaptado com barra magnética para agitação, contendo citronelal (1,0 g, 6,5 mmol) e metanol anidro (20 mL), foi adicionado ácido sulfúrico concentrado (0,1 mL). A mistura resultante foi mantida em refluxo por 3 horas. Foi adicionado uma solução saturada de carbonato de sódio. O produto da reação foi extraído com éter etílico (3 x 30 mL). As fases orgânicas foram unidas e seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório. O produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna utilizando como fase móvel hexano/acetato de etila (8: 2), obtendo-se 0,6 g (47 %) do material.



M.M. 200,18 g mol^{-1}

Dados espectrais:

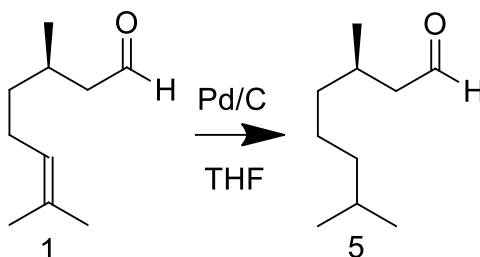
E.M. m/z (abundância relativa %): 199 (2); 185 (2); 168 (3); 121 (62); 95 (36); 86 (21); 85 (35); 81 (37); 75 (100); 69 (29); 67 (19); 55 (21); 47 (17); 41 (38).

IV (cm^{-1}): 548, 582, 741, 829, 914, 966, 1055, 1126, 1192, 1377, 1458, 1647, 1732, 2926, 3491.

RMN de ^1H (400 MHz - CDCl_3) δ (ppm): 0,94 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H) 1,21 (m, 2H) 1,38 (m, 2H) 1,62 (s, 3H) 1,63 (m, 1H) 1,69 (s, 3H) 2,0 (m, 2H) 3,32 (s, 3H) 3,34 (s, 3H) 4,47 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H) 5,11 (t, $J = 7,1$ Hz, 1H)

RMN de ^{13}C (100 MHz CDCl_3) δ (ppm): 17,6; 19,7; 25,4; 25,7; 28,8; 37,4; 39,5; 52,2; 52,7; 103,3; 124,7; 131,2.

2.4.1.4 Preparação do 3,7 dimetiloctanal



A um balão de 25 mL, equipado com agitação magnética e mantido sob pressão em atmosfera de hidrogênio, foi adicionado Pd/C (0,200 g), THF (25 mL) e citronelal (1,0 g, 6,5 mmol). A mistura reacional foi mantida à temperatura ambiente durante 72 horas. O conteúdo do balão foi filtrado em celite (2,0 g) utilizando éter etílico como solvente, posteriormente o solvente foi evaporado à pressão reduzida. Obtendo-se 0,9 g (91%) do material (YAZAR et al., 2011).

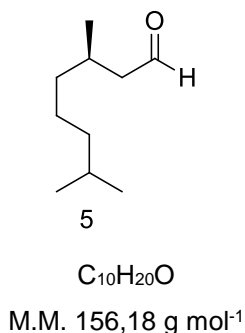
Dados espectrais:

E.M. m/z (abundância relativa %): 112 (50); 97 (23); 84 (44); 69 (82); 71 (94); 56 (100).

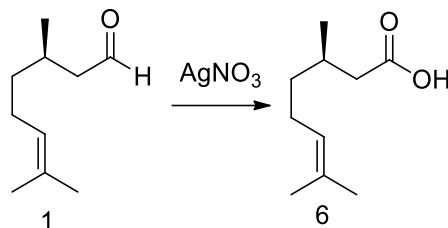
IV (cm^{-1}): 525, 679, 1018, 1157, 1373, 1466, 1728, 2716, 2947, 3441.

RMN de ^1H (400 MHz - CDCl_3) δ (ppm): 0,88 (d, $J = 6,6$ Hz, 6H), 0,98 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H), 1,2 (m, 6H), 1,6 (m, 6H), 1,8 (m, 1H), 2,0 (m, 1H), 2,4 (m, 1H), 9,7 (t, $J = 2,41$ Hz, 1H).

RMN de ^{13}C (100 MHz CDCl_3) δ (ppm): 20,0; 22,5; 22,6; 24,6; 25,6; 27,9; 28,2; 37,2; 39,0; 51,1; 67,96; 203,1.

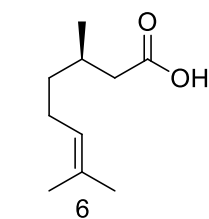


2.4.1.5 Preparação do Ácido citronílico



Em um balão de 250 mL, adaptado com barra magnética para agitação, contendo uma solução de NaOH (75 mL, 5 molL⁻¹) adicionou-se gota-a-gota uma solução de AgNO₃ (75 mL, 100 mmol) sob agitação, em banho de gelo, por 30 min. Após adicionou-se lentamente uma solução de citronelal (10,62 g, 64 mmol) em éter etílico (50 mL). A mistura resultante foi mantida sob agitação por 24 horas. A reação foi filtrada com celite a vácuo. O filtrado foi acidificado com HCl (20 ml, 1 molL⁻¹) até pH 1. O produto da reação foi extraído com éter etílico (3 x 30 mL). As fases orgânicas foram unidas e seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório obtendo-se 60 % do material (HERETSCH, 2009).

Dados espectrais:



C₁₀H₁₈O₂

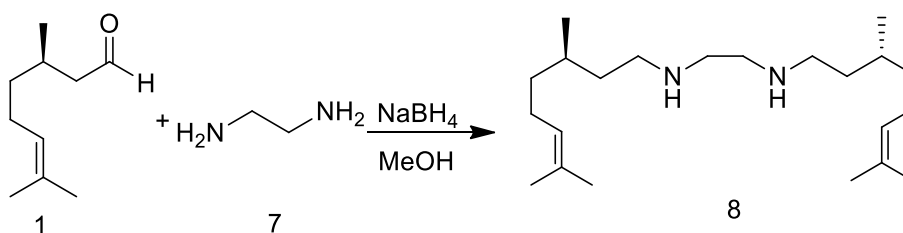
M.M. 170,13 g mol⁻¹

IV (cm⁻¹): 478, 617, 679, 833, 941, 1234, 1296, 1435, 1713, 2932.

RMN de ¹H (200 MHz - CDCl₃) δ (ppm): 0,98 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H), 1,30 (m, 3H), 1,6 (s, 3H), 1,7 (s, 3H), 2,2 (m, 6H) 5,09 (t, *J* = 7,12 Hz, 1H).

RMN de ¹³C (50 MHz CDCl₃) δ (ppm): 17,6; 19,6; 24,4; 25,7; 29,8; 36,7; 41,5; 124,2; 131,7; 179,5.

2.4.1.6 Preparação do N1, N3-*bis*(3,7-dimetil-oct-6-en-1-il)etano-1,2-diamina



Em um balão de 50 mL, adaptado com barra magnética para agitação, contendo citronelal (2,3 g, 15 mmol) e metanol (30 mL), foi adicionada etileno diamina

(0,45 g, 7,5 mmol) em metanol 10 mL. O meio reacional foi aquecido a 40 °C por 4 h. Em seguida foi adicionado aos poucos Boro hidreto de sódio (1,13 g, 30 mmol) e a mistura foi aquecida por mais 6 horas. Foi adicionado 100 mL de água e depois adicionado gota a gota HCl até pH 2 e em seguida solução de hidróxido de Sódio (pH 11). O produto da reação foi extraído com etanol/éter etílico (1/1) (3 x 30 mL). As fases orgânicas foram unidas e seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório. O produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna utilizando como fase móvel hexano/acetato de etila (6: 4) obtendo-se 1,5 g (58 %) do material (FUJIOKA et al., 2005; KRASAVIN, 2012).

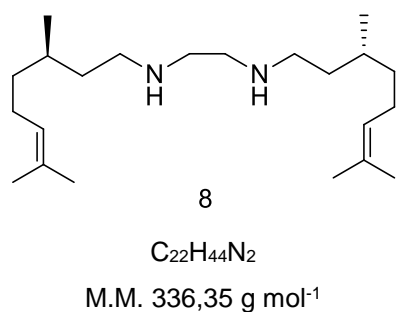
Dados espectrais:

E.M. m/z (abundância relativa %): 289 (11); 249 (7); 221 (25); 207 (37); 166 (46); 152 (19); 138 (13); 137 (24); 125 (13); 124 (29); 121 (15); 111 (16); 98 (100); 97 (49); 81 (37); 69 (57); 56 (38); 41 (67).

IV (cm⁻¹): 507, 600, 721, 845, 968, 1173, 1217, 1427, 1462, 2361, 2857, 2928, 2957.

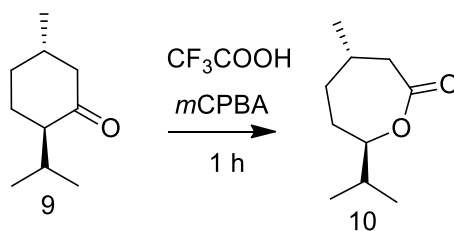
RMN de ¹H (400 MHz - CDCl₃) δ (ppm): 0,91 (d, *J* = 6,0 Hz, 6H) 1,34 (m, 12H) 1,62 (s, 6H) 1,71(s, 6H) 1,99 (m, 4H) 2,68 (m, 8H) 5,11 (m, 2H).

RMN de ¹³C (100 MHz - CDCl₃) δ (ppm): 17,7; 19,5; 25,5; 26,7; 30,6; 36,4; 37,1; 37,3; 47,5; 48,1; 124,7; 131,28.



2.5.2 Modificação estrutural de terpenos

2.4.2.1 Preparação do (4*S*,7*R*)-7-isopropil-4-metiloxepan-2-ona



Em um balão de 50 mL, adaptado com barra magnética para agitação, contendo mentona (3,08 g, 20 mmol) e ácido trifluoroacético (1,53 mL, 30 mmol) em diclorometano (30 mL), foi adicionado ácido 3-cloroperoxibenzóico (*m*CPBA) 77%

(6,88 g, 40 mmol) à temperatura ambiente em pequenas porções ao longo de um período de 10 min. A mistura reacional foi agitada por 1 h, a reação foi analisada por CCD em intervalos de 1 h até a indicação do consumo completo da cetona. Filtrou-se a suspensão resultante e o filtrado foi arrefecido a 0 °C sendo que o precipitado adicional foi removido por meio de uma segunda filtração. O filtrado resultante foi sequencialmente lavado com soluções de bissulfito de sódio saturado, bicarbonato de sódio saturado, e solução saturada de cloreto de sódio. O produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna utilizando como fase móvel hexano/acetato de etila (8: 2) obtendo-se 2,5 g (75 %) do material (MARELL et al., 2014).

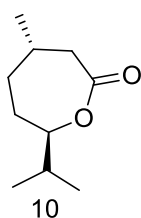
Dados espectrais:

E.M. m/z (abundância relativa %): 127 (51); 109 (10); 99 (55); 81 (100); 69 (71); 55 (50).

IV (cm⁻¹): 1018, 1111, 1157, 1234, 1281, 1373, 1450, 1728, 2947.

RMN de ¹H (400 MHz - CDCl₃) δ (ppm): 0,95 (m, 9H), 1,5 (m, 2H), 1,6 (M, 2H), 1,7 (m, 2H), 1,9 (m, 2H) 2,5 (m, 1H) 4,14 (dd, J = 7,19 Hz, 1H).

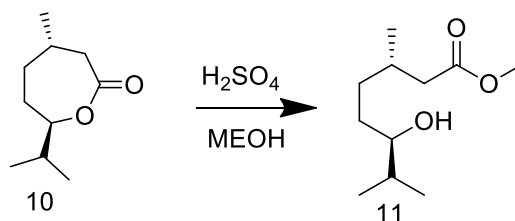
RMN de ¹³C (100 MHz CDCl₃) δ (ppm): 12,1; 20,7; 22,7; 25,3; 31,6; 34,6; 34,7; 42,6; 84,8; 174,9.



C₁₀H₁₈O₂

M.M. 170,13 g mol⁻¹

2.4.2.2 Preparação do (3S, 6R)-metil 6-hidroxi-3,7-dimetiloctanoato



Em um balão de 50 mL, adaptado com barra magnética para agitação, contendo a lactona (1,0 g; 6 mmol) em metanol anidro (20 mL) foi adicionado H₂SO₄ concentrado (2 gotas) e a mistura foi submetida a refluxo durante 5 min. Após arrefecimento, foi adicionado NaHCO₃ aquoso saturado. O produto da reação foi extraído com éter etílico (3 x 30 mL). As fases orgânicas foram unidas e seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório, obtendo-se um óleo incolor (0,78 g; 92 %) (ISHMURATOV et al., 2015).

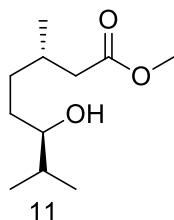
Dados espectrais:

E.M. m/z (abundância relativa %): 185 (1), 159 (18), 127 (100), 101 (25), 87 (18), 81 (44).

IV (cm⁻¹): 1003, 1204, 1265, 1373, 1450, 1728, 2947, 3456.

RMN de ¹H (200 MHz - CDCl₃) δ (ppm): 0,91 (d, *J* = 6,38 Hz, 3H), 0,93 (d, *J* = 6,38 Hz, 3H), 0,96 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H), 1,24 (m, 2H), 1,36 (m, 2H), 1,53 (m, 2H), 1,66 (m, 2H), 2,23 (m, 2H), 3,34 (m, 1H), 3,67 (s, 3H).

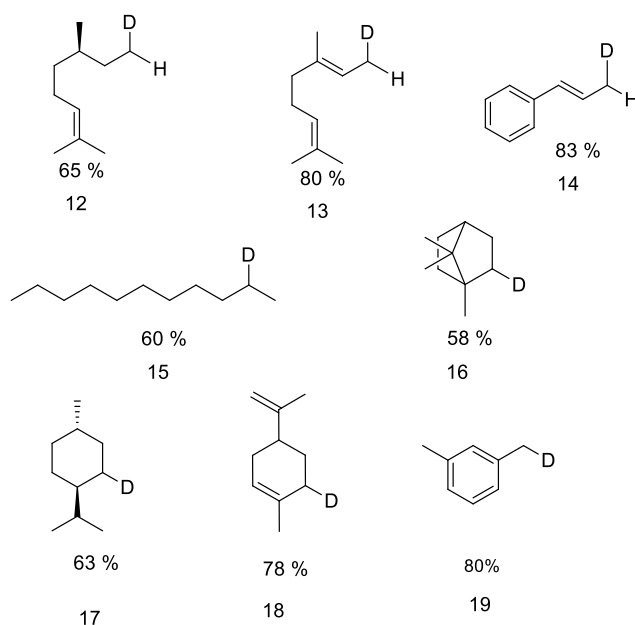
RMN de ¹³C (50 MHz CDCl₃) δ (ppm): 16,9; 18,7; 19,9; 30,5; 31,4; 33,0; 33,4; 41,4; 51,4; 76,7; 173,7.



C₁₁H₂₃O₃

M.M. 202,16 g mol⁻¹

2.5.3 Procedimento geral para obtenção dos derivados (D)



Em um balão de 50 mL, adaptado com barra magnética para agitação, pesou – se os aldeídos ou cetonas de interesse (7 mmol) em 15 mL de solvente, adicionou-se uma solução do reagente D (8 mmol) em 10 mL de solvente. A reação foi mantida sob agitação constante na temperatura ambiente por 3 horas. O produto da reação foi extraído com solvente. As fases orgânicas foram unidas e seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório. O produto obtido foi purificado por

cromatografia flash utilizando como fase móvel hexano/acetato de etila (8: 2) obtendo-se rendimento entre 58 – 83 %.

2.6 TESTES DE REPELÊNCIA

Os testes de repelência foram realizados no Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária, situado no Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná, a uma temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de 50 a 60%. Os dados de temperatura e umidade relativa, foram monitorados e registrados utilizando um termo higrômetro digital durante os experimentos.

Para a realização dos testes foram utilizadas gaiolas de madeira com telas nas laterais e vidro na face superior medindo, 30 cm x 30 cm x 30 cm, com 20 fêmeas do mosquito *A. aegypti*, todas copuladas sem ter passado pelo repasto sanguíneo. Os testes foram realizados no período diurno, respeitando a preferência para a atividade de hematofagia do mosquito.

Para os testes uma das mãos do analisador foi higienizada com sabão neutro e em seguida a face superior, inferior, lateral e a região entre os dedos, foram tratadas com soluções dos possíveis repelentes em etanol. Os compostos e suas combinações ou variações destes tiveram suas atividades de repelência avaliadas. Para os testes foram preparadas diferentes concentrações dos possíveis repelentes, diluídos em etanol, a um volume total final de 1,0 mL.

A mão fechada foi introduzida na gaiola para realização dos testes conforme a Figura 14, com o analisador sentado, ou seja, em posição de descanso, não tendo realizado esforço físico anteriormente à realização dos testes.

Ocorrendo a segunda picada o experimento era interrompido e o tempo registrado com o auxílio de um cronômetro digital.

FIGURA 14 – Posicionamento da mão na gaiola durante os testes realizados.



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DOS COMPLEXOS DE MANGANÊS

Durante os bioensaios realizados com quatro complexos de manganês diferentes, a mortalidade das larvas foi verificada a cada 24 horas até duração de 96 horas (4 dias). As larvas incapazes de atingir a superfície da água ou imóveis quando submetidas a estímulos e batidas sucessivas na parede dos copos com pipeta de Pasteur, foram consideradas como mortas. As larvas mortas foram descartadas a cada leitura de 24 horas. Os resultados obtidos podem ser observados nas Tabela 2 a 5.

TABELA 2 – Porcentagem de mortalidade larval utilizando os complexos de Manganês, sobre imaturos de *Aedes aegypti* (n = 60) da colônia Rockefeller, na concentração de 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com duração de 24 horas.

Complexo	fac-4meim	fac-im	fac-2fenil	fac-2meim
Concentrações	M.L. (%)	M.L. (%)	M.L. (%)	M.L. (%)
30 $\mu\text{mol L}^{-1}$	15,0	1,6	0,0	0,0
40 $\mu\text{mol L}^{-1}$	8,3	1,6	0,0	0,0
70 $\mu\text{mol L}^{-1}$	16,6	1,6	0,0	1,6
100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	25,0	5,0	3,3	5,0
150 $\mu\text{mol L}^{-1}$	23,3	3,3	0,0	3,3
Controle	0,0	0,0	0,0	0,0

M.L. = porcentagem da mortalidade larval; n = número total de larvas expostas, mantidos sob condições constante em câmara tipo BOD, temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 1$), umidade ($70\% \pm 10$) e foto período (12:12) controlados em câmara climatizada. FONTE: o autor (2017)

TABELA 3 – Porcentagem de mortalidade larval utilizando os complexos de Manganês, sobre imaturos de *Aedes aegypti* (n = 60) da colônia Rockefeller, na concentração de 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com duração de 48 horas.

Complexo	fac-4meim	fac-im	fac-2fenil	fac-2meim
Concentrações	M.L. (%)	M.L. (%)	M.L. (%)	M.L. (%)
30 $\mu\text{mol L}^{-1}$	33,3	6,6	1,6	0,0
40 $\mu\text{mol L}^{-1}$	35,0	10,0	0,0	0,0
70 $\mu\text{mol L}^{-1}$	38,3	20,0	16,6	8,3
100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	41,6	21,6	21,6	8,3
150 $\mu\text{mol L}^{-1}$	53,3	21,6	23,3	18,3
Controle	0,0	0,0	0,0	0,0

M.L. = porcentagem da mortalidade larval; n = número total de larvas expostas, mantidos sob condições constante em câmara tipo BOD, temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 1$), umidade ($70\% \pm 10$). FONTE: o autor (2017)

TABELA 4 – Porcentagem de mortalidade larval utilizando os complexos de Manganês, sobre imaturos de *Aedes aegypti* (n = 60) da colônia Rockefeller, na concentração de 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com duração de 72 horas.

Complexo	<i>fac-4meim</i>	<i>fac-im</i>	<i>fac-2fenil</i>	<i>fac-2meim</i>
Concentrações	M.L. (%)	M.L. (%)	M.L. (%)	M.L. (%)
30 $\mu\text{mol L}^{-1}$	50,0	13,3	45,0	15,0
40 $\mu\text{mol L}^{-1}$	53,3	11,6	45,0	0,0
70 $\mu\text{mol L}^{-1}$	66,6	28,3	56,6	28,3
100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	81,6	36,6	55,0	28,3
150 $\mu\text{mol L}^{-1}$	81,6	35,0	85,0	53,3
Controle	0,0	0,0	0,0	0,0

M.L. = porcentagem da mortalidade larval; n = número total de larvas expostas, mantidos sob condições constante em câmara tipo BOD, temperatura ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$), umidade ($70\% \pm 10$) e foto período (12:12) controlados em câmara climatizada. FONTE: o autor (2017)

TABELA 5 – Porcentagem de mortalidade larval utilizando os complexos de Manganês, sobre imaturos de *Aedes aegypti* (n = 60) da colônia Rockefeller, na concentração de 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com duração de 96 horas.

Complexo	<i>fac-4meim</i>	<i>fac-im</i>	<i>fac-2fenil</i>	<i>fac-2meim</i>
Concentrações	M.L. (%)	M.L. (%)	M.L. (%)	M.L. (%)
30 $\mu\text{mol L}^{-1}$	63,3	48,3	73,3	71,6
40 $\mu\text{mol L}^{-1}$	75,0	56,6	86,6	81,6
70 $\mu\text{mol L}^{-1}$	85,0	65,0	88,3	90,0
100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	93,3	71,6	91,6	98,3
150 $\mu\text{mol L}^{-1}$	100	85,0	98,3	98,3
Controle	0,0	0,0	0,0	0,0

M.L. = porcentagem da mortalidade larval; n = número total de larvas expostas, mantidos sob condições constante em câmara tipo BOD, temperatura ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$), umidade ($70\% \pm 10$) e foto período (12:12) controlados em câmara climatizada. FONTE: o autor (2017)

Os resultados dos bioensaios indicam que três dos complexos atingiram porcentagem de mortalidade superior a 60 % a partir de 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, porém com efeito mais acentuado para os quatro complexos em 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para 96 horas.

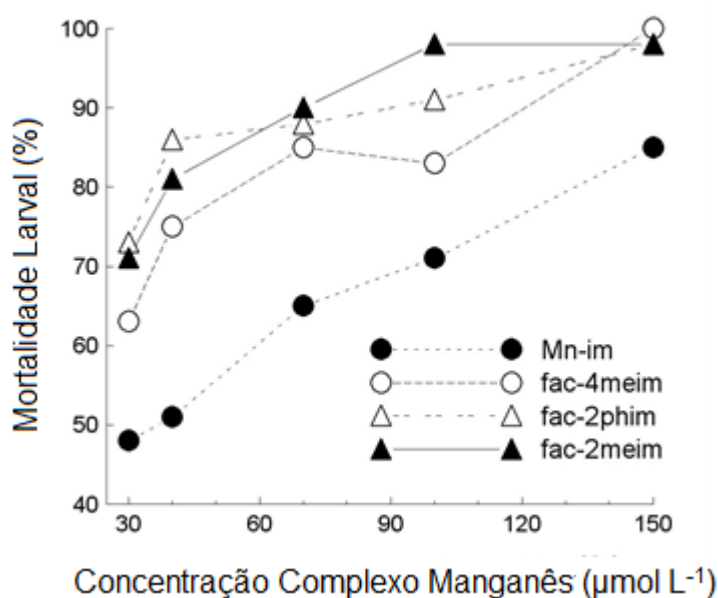
Três dos complexos avaliados para o controle populacional de *A. aegypti* (*fac-4meim*, *fac-2fenil* e *fac-2meim*) causaram 90 % de mortalidade no intervalo de concentração de 60 a 84 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (tabela 6), apresentando elevado potencial para o controle do vetor. Os resultados evidenciam que todos os complexos afetam o desenvolvimento larval, sinalizando para mecanismo de ação que dificulta a passagem para o estágio de pupa, inviabilizando a emergência de adultos. Para o complexo Mn-im o mesmo efeito foi observado para uma concentração de 1490 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Tabela 6, gráfico 1).

TABELA 6 – Concentrações letais (CL) após 24 horas de exposição de larvas de *Aedes aegypti* aos complexos de manganês.

Complexo	CL 50 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	CL 90 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	CL 95 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	CL 99 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
fac-im	34	273	492	1490
fac-4meim	20	84	125	269
fac-2fenil	11	68	115	304
fac-2meim	17	60	85	167

FONTE: o autor (2017)

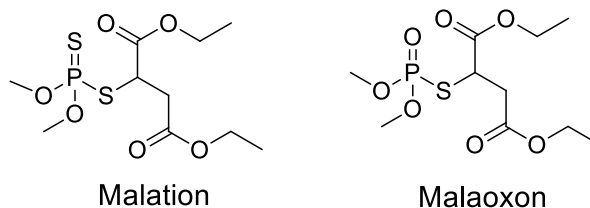
GRÁFICO 1 – Porcentagem de mortalidade larval utilizando os complexos de Manganês, sobre imaturos de *Aedes aegypti*, na concentração de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$, $40 \mu\text{mol L}^{-1}$, $70 \mu\text{mol L}^{-1}$, $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ com duração de 96 horas.



3.2 ENSAIOS DAS ENZIMAS ACETILCOLINESTERASE (AChE) COM COMPLEXO DE MANGANÊS

Quando um ser vivo entra em contato com um inseticida organofosforado a reação do organismo é eliminar este composto. Para isso o sistema de defesa deve oxidar ou degradar o inseticida em um composto mais solúvel, como por exemplo, para o Malation, o novo composto é o Malaoxon (Figura 15). Porém, este metabólito apresenta afinidade pela enzima acetilcolinesterase (AChE), impedindo de realizar suas funções biológicas, podendo levar à morte do indivíduo (LIONETTO et al., 2003).

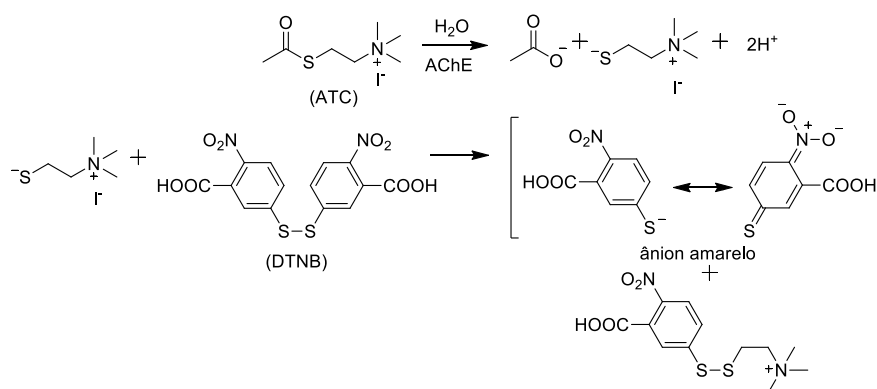
FIGURA 15 – Estrutura do Malation e do Malaoxon



A quantificação efetiva do quanto um determinado composto afeta um organismo, pode ser mensurada através de marcadores bioquímicos, como a atividade enzimática das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e esterase alfa (EST- α). Estas respostas permitem a detecção dos primeiros efeitos biológicos relacionados com a exposição a produtos antropogênicos tóxicos, ou seja, são aqueles derivados de atividades humanas, em oposição a aqueles que ocorrem em ambientes naturais sem influência humana. (VALLE et al., 2006).

Para a enzima acetilcolinesterase (AChE) o princípio do método é o desenvolvimento da reação colorida que ocorre entre o ATC (Iodeto de acetiltiocolina) e o DTNB (ácido 5,5-ditio-*bis*-2-nitrobenzóico) na presença da AChE (Esquema 2) (ELLMAN et al., 1961).

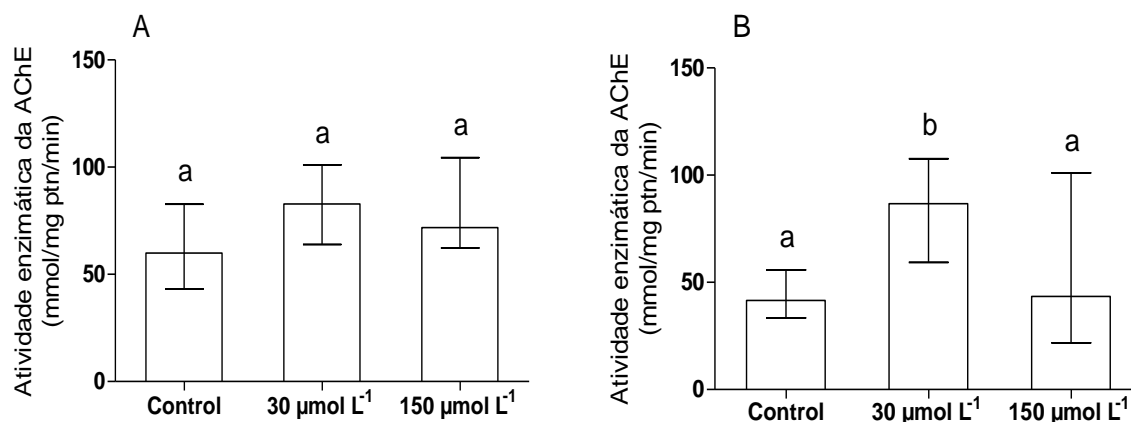
ESQUEMA 2 – Representação da catálise enzimática da acetil colinesterase.



FONTE: Ellman (1961).

A atividade enzimática foi avaliada para o complexo *fac*-4meim tendo em vista que foi o único complexo que na concentração de 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ resultou em 100 % de mortalidade das larvas de *A. aegypti*. A Figura 16 apresenta os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos.

FIGURA 16 – Toxicidade aguda após a aplicação do complexo fac-4meim com o controle através da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), após exposição de 72 horas (A) e 96 horas (B) das larvas de *A. aegypti*.



Os resultados expressam média da atividade enzimática \pm erro padrão ($n = 20$ para cada grupo) (foi utilizado ANOVA - *one way* e os contrastes de Tukey). Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$. FONTE: o autor (2017)

Os resultados indicam que quando os mosquitos são expostos cronicamente em 72 horas não ocorre diferença na atividade em ambas as concentrações avaliadas em relação ao controle. Para 96 horas ocorre um pequeno aumento na atividade enzimática na concentração de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ do que a $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ não há diferença entre o tratamento e o controle. Os resultados indicam que a atividade larvicida observada para o complexo fac-4meim não envolve a inibição da enzima (AChE). Este resultado é interessante pois a atividade pode estar ocorrendo via outro mecanismo de ação.

3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ADULTICIDA

3.3.1 Aplicação direta das substâncias na câmara de vidro

Visando avaliar a atividade adulticida frente a fêmeas de *A. aegypti*, foi avaliado 6 substâncias individualmente entre eles: o Linalol, um produto natural chamado de PN, Mentona, Pulegona, *p*-mentano-3,8-diol e Eugenol (Figura 17), estas substâncias foram isoladamente aplicadas, sem solvente, no interior de câmaras de vidro. A identidade química de um dos compostos bem como a proporção entre eles está sendo preservadas, tendo em vista o potencial de aplicação desses compostos no desenvolvimento de produto comercial com atividade repelente e/ou adulticida ao *A. aegypti*. Durante os testes foram utilizadas 10 fêmeas do mosquito *A. aegypti*. A Tabela 7 mostra a mortalidade dos insetos após a aplicação.

FIGURA 17 – Estrutura dos compostos utilizados durante os testes aduicidas na câmara de vidro.

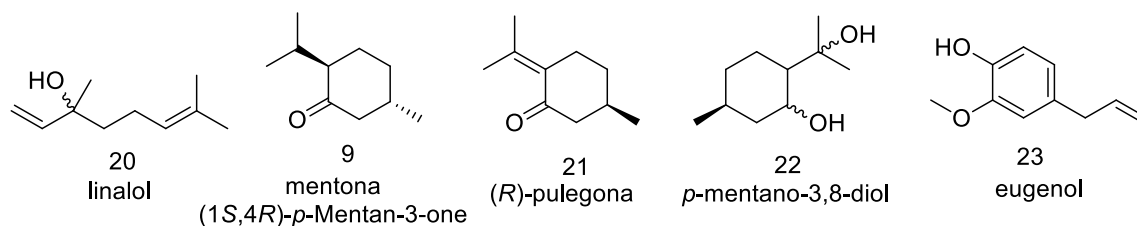


TABELA 7 – Verificação da atividade inseticida e perda da atividade de voo dos compostos individualmente na câmara de vidro (n = 10).

Nº	Substância	Quantidade	5 min*	15 min*	30 min*	24 h*
1	Linalol Racemico	10 µL	10	10	10	10
2	PN	10 mg	10	10	10	7
3	Mentona	10 µL	0	10	10	5
4	Pulegona	10 µL	10	10	8	8
5	p-mentano-3,8-diol Racemico	10 µL	0	0	0	7
6	Eugenol	10 µL	0	5	7	10

*Número de insetos sem atividade de voo.

Para as entradas 1 e 4 não foi observado atividade de voo após 1 minuto da aplicação, no entanto para a Pulegona os testes revelaram que alguns insetos perdem a atividade de voo, porém acabam se recuperando após 24 horas. Para entrada 5 não foi observada alteração na atividade de voo, porém após 24 horas 7 mosquitos estavam mortos e para o Eugenol, observou uma diminuição na atividade de voo a partir de 15 minutos, atingindo mortalidade total em 24 horas.

Com isso para dar continuidade aos testes resolveu-se diminuir a quantidade dos componentes que apresentaram melhor atividade na câmara de vidro (Tabela 8).

TABELA 8 – Verificação da atividade inseticida e perda da atividade de voo dos compostos individualmente variando a quantidade na câmara de vidro (n = 10).

Nº	Substância	Quantidade	5 min*	15 min*	1 h*	24 h*
1	Linalol	1 µL	7	9	7	9
		5 µL	10	10	8	10
		10 µL	10	10	10	10
2	PN	1 mg	7	7	7	7
		5 mg	7	8	10	10
		10 mg	10	10	10	10
3	Pulegona	1 µL	5	5	5	8
		5 µL	7	7	7	10
		10 µL	7	7	7	10

*Número de insetos sem atividade de voo.

Todos os testes demonstraram boa mortalidade. O Linalol apresentou o melhor resultado sendo que os insetos morrem quase instantaneamente após a aplicação, com concentração superior a 5 µL.

Na sequência dos testes foram feitas combinações com o Linalol, o PN e a Pulegona (entradas 1 e 2). A Pulegona foi adicionada na mesma proporção do Linalol na tentativa de potencializar o efeito adulticida, considerando que estas foram as substâncias que apresentaram melhor resultados nos testes anteriores. Também foi realizado teste com uma mistura entre Linalol/Pulegona 1/1 (entrada 3) na tentativa de verificar a importância do PN na mistura. A Tabela 9 apresenta os resultados com as combinações testadas.

TABELA 9 – Verificação da atividade inseticida e perda da atividade de voo da combinação entre os compostos na câmara de vidro (n = 10).

Nº	Quantidade do material	Proporção	Quantidade	5 min*	15 min*	30 min*	24 h*
1	Linalol/Pulegona/PN	(5/5/1)	10 µL	5	5	5	10
2	Linalol/Pulegona/PN	(5/5/1)	15 µL	5	10	10	10
3	Linalol/Pulegona	(1/1)	10 µL	1	1	5	5

*Número de insetos sem atividade de voo.

Quando adicionado somente 10 µL da mistura (entradas 1, Tabela 9) observou-se que os insetos demoram a morrer, mas ao final de 24 horas a mortalidade foi total. Ao adicionar 15 µL da mistura foi observado que em 15 minutos já havia mortalidade total dos insetos permanecendo assim por 24 horas. Já com a mistura da entrada 3 não foi observado mortalidade total dos insetos, sendo possível concluir que PN é importante na atividade adulticida.

Misturas das substâncias que apresentaram os melhores resultados adulticida foram também testadas em spray, simulando situações reais para possível aplicação do produto.

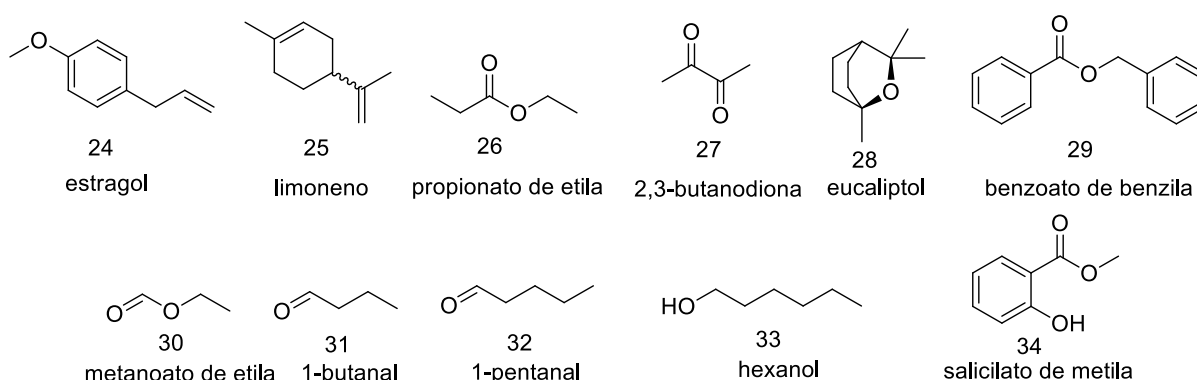
3.3.2 Aplicação das substâncias em papel filtro

É recomendado pela WHO 2006 que testes de contato utilizando fêmeas adultas de mosquitos *A. aegypti* sejam efetuados impregnando-se papel de filtro com as substâncias a serem testadas em câmaras cilíndricas. Após a exposição por 15 minutos, os insetos são transferidos para outra câmara disposta em anexo pela simples abertura de uma porta que permite a transferência dos insetos sem tocá-los.

Os insetos sem atividade de voo são deixados na câmara por 24 horas com fonte de alimento e água para avaliar se foram realmente mortos pelo tratamento.

Inicialmente foram realizados testes preliminares com substâncias que apresentam atividades inseticidas já descritas na literatura (VIEGAS JÚNIOR, 2003; CORRÊA e SALGADO, 201; TURNER et al., 2011), na tentativa de potencializar o efeito adúlticida. As substâncias selecionadas foram Estragol, Limoneno, Propionato de Etila, 2,3 Butanodiona, Eucaliptol, Benzoato de benzila, Metanoato de etila, 1-Butanal, 1-Pentanal, 1-Hexanol, Salicilato de metila (Figura 18).

FIGURA 18 – Estrutura dos compostos utilizados durante os testes adúlticidas em papel filtro.



Para a realização desses testes de contato foram utilizadas 10 fêmeas do mosquito, para cada tratamento. Primeiramente foram realizados testes com os compostos individualmente. Foram preparadas soluções de 10 µL em 1 mL de pentano e os resultados de mortalidade observados nos testes estão na Tabela 10, após evaporação do solvente.

TABELA 10 – Verificação da atividade inseticida e perda da atividade de voo com os compostos individualmente em papel filtro (n = 10).

Nº	Substância	Quantidade	3 min	5 min	7 min	10 min	15 min	1 h	24 h
1	Estragol	10 µL	0	0	0	0	0	0	0
2	Limoneno Racemico	10 µL	0	0	0	0	0	0	0
3	Propionato de etila	10 µL	0	0	0	0	0	0	0
4	2,3-Butanodiona	10 µL	0	0	0	0	0	0	0
5	Eucaliptol	10 µL	0	0	0	0	0	0	0
6	1-Butanal	10 µL	0	0	0	0	0	0	0
7	1-Pentanal	10 µL	0	0	0	0	0	0	0
8	Metanoato de etila	10 µL	0	0	0	0	0	7	0
9	Benzoato de Benzila	10 µL	0	0	0	7	7	8	0
10	1-Hexanol	10 µL	0	8	8	8	9	10	0

Para as entradas de 1 a 7 não foi observada mortalidade após a aplicação e os insetos permaneceram vivos até 24 horas após os testes. Para o Metanoato de etila (entrada 8) foi observado que 7 insetos não tinham mais atividade de voo, porém, após 24 horas todos estavam voando novamente.

Para o benzoato de benzila (entrada 9) foi observado que após 10 minutos da aplicação do material 8 insetos não apresentavam atividade de voo, porém, após 24 horas todos estavam vivos e ativos.

Para o 1-hexanol após 5 minutos da aplicação, 8 insetos não tinham atividade de voo, porém, após 24 horas todos os insetos estavam vivos e voando.

Os testes da tabela 10 demonstram que após 24 horas os insetos permanecem vivos com atividade de voo, denotando que, embora algumas substâncias possam derrubar os insetos, seus efeitos adulticidas são reduzidos. No entanto essas substâncias podem ser usadas em uma eventual mistura contendo compostos que, mais a longo prazo, matam os insetos.

Também foram realizados testes com combinações destes componentes com a mistura Linalol/PN que possui a melhor atividade adulticida observada anteriormente, na tentativa de avaliar se algum destes componentes potencializa a atividade já observada. Foi utilizado 5 µL de cada componente mais 5 µL da mistura Linalol/PN diluídas em 1 mL de pentano e aplicado em papel filtro. Os resultados de mortalidade para estes testes estão descritos na Tabela 11.

TABELA 11 – Verificação da atividade inseticida e perda da atividade de voo com os compostos mais a mistura Linalol/PN.

Nº	Tratamentos	Proporção	Quantidade	3 min	5 min	7 min	10 min	15 min	1 h	24 h
1	Linalol/PN/Estragol	5/1/5	10 µL	3	4	4	8	8	8	6
2	Linalol/PN/Limoneno	5/1/5	10 µL	5	6	7	9	10	10	6
3	Linalol/PN/Propionato de etila	5/1/5	10 µL	0	7	10	10	10	10	6
4	Linalol/PN/2,3 Butanodiona	5/1/5	10 µL	3	4	7	9	10	10	7
5	Linalol/PN/Eucaliptol	5/1/5	10 µL	3	7	7	10	10	10	4
6	Linalol/PN/1-Butanal	5/1/5	10 µL	0	2	3	6	8	8	7
7	Linalol/PN/1-Pentanal	5/1/5	10 µL	0	6	8	9	9	9	5
8	Linalol/PN/Metanoato de etila	5/1/5	10 µL	3	6	8	10	10	10	4
9	Linalol/PN/Benzoato de Benzila	5/1/5	10 µL	0	4	4	5	9	9	0
10	Linalol/PN/1-Hexanol	5/1/5	10 µL	7	7	7	10	10	10	6
11	Linalol/PN	5/1	10 µL	10	10	10	10	10	10	10

Os testes demonstraram que a maioria dos mosquitos não apresentavam atividade de voo na primeira hora após a aplicação. Porém após 24 horas de observação alguns mosquitos recuperavam suas atividades.

Também foi observado que a mistura original foi a que apresentou maior atividade e que a adição das substâncias testadas não conseguiu melhorar a atividade da mistura original.

Decidiu-se também realizar testes com as 4 substâncias que apresentaram melhor atividade individualmente nas câmaras de vidro (Tabela 7 e Tabela 8), então foram preparadas soluções de 10 µL e 50 µL em 1 mL de pentano e os resultados de mortalidade observados nos testes estão na Tabela 12.

TABELA 12 – Verificação da atividade inseticida e perda da atividade de voo com os compostos individualmente em papel filtro (n = 10).

Nº	Substância	Quantidade	5 min	15 min	1 h*	24 h*
1	Linalol	10 µL	9	9	9	10
		50 µL	10	10	10	10
2	PN	10 µL	0	0	0	10
		50 µL	5	7	10	10
3	Eugenol	10 µL	0	0	0	10
		50 µL	0	0	0	10
4	Pulegona	10 µL	7	7	7	10
		50 µL	10	10	10	10

*Número de insetos mortos.

Todos os testes demonstraram boa mortalidade para os compostos individualmente. O Linalol e a Pulegona apresentaram os melhores resultados sendo que os insetos morrem quase instantaneamente após a aplicação mesmo utilizando a menor quantidade testada. Para a substância nominada como PN houve uma baixa mortalidade em 1 hora quando aplicado 10 µL, no entanto quando aplicado 50 µL a mortalidade foi total após 1 hora. Para o Eugenol nenhum dos volumes aplicados mostraram boa mortalidade em 1 hora, porém atingiu mortalidade total em 24 horas.

Também foram realizados testes com uma mistura entre Linalol/PN 5/1, e combinações com o Linalol, o PN e a Pulegona em uma proporção de, 5/1/5, respectivamente. A Pulegona foi adicionada na mesma proporção do Linalol na tentativa de potencializar o efeito aduictida, considerando que estas foram as substâncias que apresentaram melhor resultados nos testes anteriores (Tabela 13).

TABELA 13 – Avaliação da atividade inseticida com a mistura dos compostos em papel filtro (n = 10).

Nº	Tratamentos	Quantidade da mistura	1 h*	24 h*
1	Linalol/PN	50 µL	9	9
2	Linalol/PN/Pulegona	50 µL	10	10

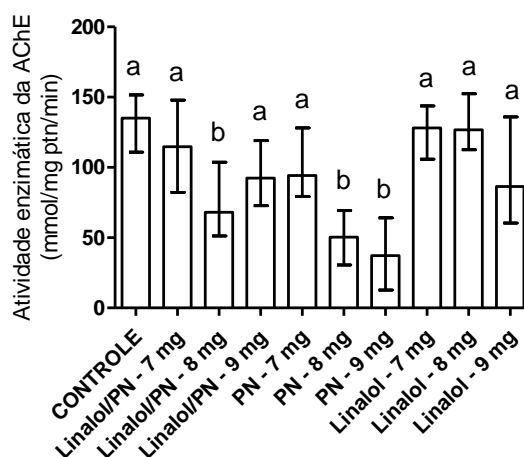
* Número de insetos mortos.

Os testes demonstraram que a maioria dos mosquitos morreram nos tratamentos. Quando adicionado a Pulegona é possível verificar um efeito mais acentuado na mortalidade. Como a diferença entre os tratamentos é pequena não foi possível afirmar se existe um efeito sinérgico na mistura.

3.3.3 Ensaios das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e esterase alfa (EST- α) das substâncias aplicadas em papel filtro

As fêmeas do mosquito provenientes dos bioensaio de toxicidade aguda e crônica, tratadas em papel filtro, foram colocadas ainda vivas em tubos tipo *Eppendorf*. O primeiro teste enzimático foi efetuado com o produto que apresentou melhor eficiência nos testes anteriores, a mistura Linalol/PN. Também foi realizado o teste com o Linalol (L) e o PN individualmente. Esses testes foram realizados com três concentrações diferentes utilizando 7 mg, 8 mg e 9 mg de cada material. A Figura 19 apresenta os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos.

FIGURA 19 – Toxicidade aguda após a aplicação da mistura Linalol/PN, do Linalol e PN com o controle através da atividade enzimática das enzimas acetilcolinesterase (AChE).



Os resultados expressam média da atividade enzimática \pm erro padrão (n = 20 para cada grupo) (foi utilizado ANOVA - *one way* e os contrastes de Tukey). Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$. FONTE: o autor (2017)

Os resultados indicam que quando os mosquitos são expostos cronicamente ao composto individualmente Linalol, não existe alteração significativa comparando com o controle (Letras diferentes, a – b, indicam diferenças significativas para $p < 0,05$).

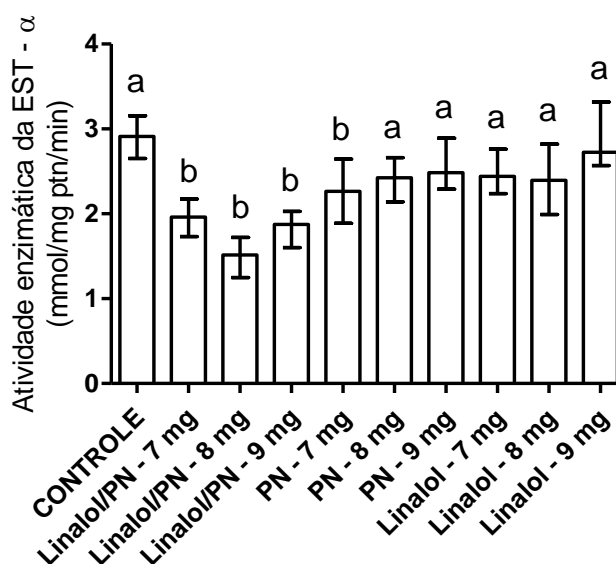
Quando os mosquitos são expostos cronicamente ao PN, ocorre uma diminuição na atividade enzimática, esta é mais intensa conforme aumenta-se a concentração, ocorrendo alteração significativa para as concentrações 8 e 9 mg.

Os resultados indicam que quando os mosquitos são expostos cronicamente à mistura Linalol/PN, ocorre variação na atividade da enzima AChE, pode-se observar que a atividade é mais acentuada para a concentração de 8 mg (Figura 19).

Os resultados dos testes enzimáticos realizados até o momento indicam que a atividade adulticida observada para a mistura Linalol/PN não envolve a inibição da enzima AChE.

Então a estratégia foi tentar determinar se o mecanismo de ação da mistura envolvia a interação com outra enzima, efetuando testes com a enzima esterase alfa (EST- α). A Figura 20 apresenta os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos.

FIGURA 20 – Toxicidade aguda após a aplicação da mistura Linalol/PN, do Linalol e PN com o controle através da atividade enzimática das enzimas esterase alfa (EST- α).



Os resultados expressam média da atividade enzimática \pm erro padrão ($n = 20$ para cada grupo) (foi utilizado ANOVA - *one way* e os contrastes de Tukey). Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$. FONTE: o autor (2017)

Os resultados indicam que quando os mosquitos são expostos cronicamente ao Linalol individualmente, não ocorre variação significativa na atividade enzimática.

Quando os mosquitos são expostos cronicamente ao PN, ocorre uma diminuição na atividade enzimática, porém há um aumento na atividade enzimática conforme aumenta-se a concentração, esta alteração só é significativa para a concentração de 7 mg.

Os resultados indicam que quando os mosquitos são expostos cronicamente à mistura Linalol/PN, ocorre uma diminuição na atividade enzimática nas três concentrações.

3.3.4 Aplicação das substâncias em spray

Para os testes iniciais com spray foram utilizados frascos de 2 mL com soluções do material em 1 mL de etanol. Selecionou as 4 substâncias que apresentaram melhor atividade nos testes anteriores (linalol, PN, pulegona e eugenol). A aplicação foi efetuada dentro das câmaras de vidro, as leituras foram efetuadas e os resultados estão na Tabela 14.

TABELA 14 – Avaliação da atividade inseticida e perda da atividade de voo com os compostos individualmente em spray (n = 10).

Nº	Material	Quantidade do material	5 min*	15 min*	30 min*	24 h*
1	Linalol	50 µL	10	10	10	10
2	PN	50 µL	10	10	10	10
3	Pulegona	50 µL	10	10	10	10
4	Eugenol	50 µL	10	10	10	10

*Número de insetos sem atividade de voo.

Quando aplicados em soluções via spray observou-se que os insetos caíram imediatamente para todos os testes, porém, por ter sido utilizados câmaras de vidro acredita-se que os insetos são expostos a uma quantidade crônica do composto não tendo a capacidade de voo que teriam em locais mais amplos.

Para realização destes testes com spray foram selecionados compostos comumente encontrados em óleos essenciais de plantas que já haviam sido descritos com atividade inseticida (CANTRELL *et al.*, 2012; ZOUBIRI e BAALIOUAMER, 2014) Na tentativa de simular uma situação mais próxima da realidade, estes compostos foram aplicados em gaiolas de madeira com telas nas laterais e vidro na face superior medindo, 30 cm x 30 cm x 30 cm, com 20 fêmeas do mosquito *A. aegypti*. Uma quantidade de 100 µL do material a ser testado foi diluída

em 1,5 mL de pentano. Foram utilizadas 20 fêmeas do mosquito para cada teste sendo que os resultados estão sumarizados na Tabela 15.

TABELA 15 – Avaliação da atividade inseticida e perda da atividade de voo com os compostos em spray (n = 20).

Nº	Substância	15 min	1 h	24 h
1	Estragol	0	0	0
2	Limoneno	0	0	0
3	Eugenol	0	0	0
4	Tetrahidrolinalol	0	0	0
5	Eucaliptol	0	0	0
6	Pulegona	0	0	0
7	Mentona	0	0	0
8	Isoeugenol	0	0	0
9	Geraniol	5	5	5
10	Benzoato de Benzila	3	3	3
11	Salicilato de Metila	5	5	5
12	Citral	3	3	3

Para as entradas de 1 a 8 não foram observadas alteração quanto à atividade de voo dos insetos e também não foi observada nenhuma mortalidade.

Para as entradas de 9 a 12, após a aplicação do material observou-se que uma parte dos insetos não apresentava atividade de voo nos primeiros minutos de experimento, porém alguns permaneciam vivos movimentando-se no chão da gaiola. Depois de 30 minutos decidiu-se adicionar a mão do analisador, devidamente higienizada, no interior da gaiola para avaliar se as fêmeas do mosquito poderiam picar. Foi observado que algumas fêmeas pousavam na mão, e algumas conseguiram picar.

Buscando simular uma situação mais próxima da realidade foram feitas formulações de sprays comerciais, a quantidade do material aplicada foi diluída em 200 mL de pentano, foram realizados testes com as misturas e ou substâncias que haviam apresentado melhor atividade até o momento. Foram utilizadas 20 fêmeas do mosquito para cada teste sendo que as leituras foram efetuadas conforme descrito na Tabela 16.

TABELA 16 – Avaliação da atividade inseticida e perda da atividade de voo com os compostos em spray (n = 20).

Nº	Material	Quantidade do material Para 200 mL de solvente	5 min*	15 min*	30 min*	24 h*
1	Linalol/PN	1,095 g	17	15	15	7
2	Linalol/PN	2,190 g	17	10	10	15
3	Linalol/PN/Eugenol	1,095 g	20	20	20	19
4	Linalol/PN/Pulegona	1,545 g	18	18	20	7
5	Linalol	0,9 g	15	13	13	1
6	Pulegona	0,9 g	19	19	19	0

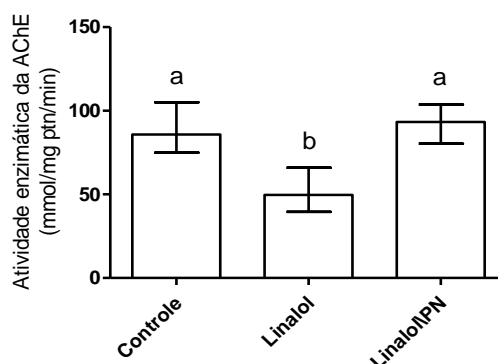
*Valores de insetos sem atividade de voo.

Após a aplicação do material observou-se que a maioria dos insetos não apresentava atividade de voo nos primeiros 5 minutos de experimento, porém alguns permaneciam vivos movimentando-se no chão da gaiola. Os insetos não apresentaram atividade de voo regular, sempre caindo no fundo da gaiola e mal conseguiam manter apoiados nas próprias pernas. Depois de 30 minutos decidiu-se adicionar a mão do analisador, devidamente higienizada e sem o tratamento de nenhum composto, no interior da gaiola para avaliar se as fêmeas do mosquito iriam picar. Foi observado que algumas fêmeas pousavam na mão, porém, por estarem desorientadas, não conseguiam picar. Vale a pena ressaltar que nesse teste, que simula uma situação mais próxima da realidade, a presença do Eugenol melhorou a eficiência da mistura Linalol/PN, provavelmente pelo efeito anestésico/paralisante que essa substância apresenta podendo contribuir para a mortalidade do inseto.

3.3.5 Ensaios das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e esterase alfa (EST- α) das substâncias aplicadas com spray

As atividades enzimáticas para os mosquitos tratados com os sprays das substâncias de interesse foram avaliadas para que as informações fossem comparadas com as informações obtidas através dos testes em papel filtro e em biorreatores. Então as fêmeas do mosquito provenientes dos bioensaio de toxicidade aguda e crônica, tratadas com o spray, foram colocadas ainda vivas em tubos tipo *Eppendorf*. O primeiro teste enzimático foi efetuado com o produto que apresentou melhor eficiência nos testes anteriores, sendo a mistura Linalol/PN. Também foi realizado o teste somente com o Linalol por se tratar do composto em maior quantidade na mistura. A Figura 21 apresenta os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos da AChE.

FIGURA 21 – Toxicidade aguda após a aplicação do Linalol e da mistura Linalol/PN com o controle através da atividade enzimática das enzimas acetilcolinesterase (AChE).

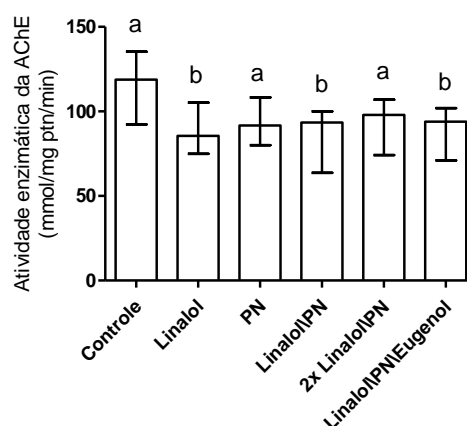


Os resultados expressam média da atividade enzimática \pm erro padrão ($n = 30$ para cada grupo) (foi utilizado ANOVA - *one way* e os contrastes de Tukey). Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$. FONTE: o autor (2017)

Os resultados indicam que quando os mosquitos são expostos cronicamente ao Linalol ocorre uma diminuição de 46 % na atividade enzimática das enzimas AChE quando comparado ao controle, porém quando expostos à mistura Linalol/PN, não existe alteração significativa.

Também foi avaliada a atividade enzimática com diferentes concentrações da mistura e com a adição do Eugenol, porque durante os testes observou que este potencializou a ação da mistura no spray. A Figura 22 apresenta os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos da AChE.

FIGURA 22 – Toxicidade aguda após a aplicação de cinco concentrações do inseticida com o controle através da atividade enzimática das enzimas acetilcolinesterase (AChE).

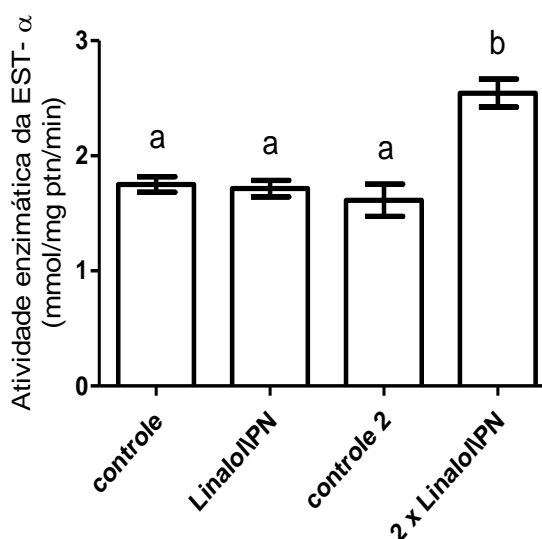


2 x Linalol/PN dobro da concentração. Os resultados expressam média da atividade enzimática \pm erro padrão ($n = 50$ para cada grupo) (foi utilizado ANOVA - *one way* e os contrastes de Tukey). Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$. FONTE: o autor (2017)

O Linalol novamente foi o que apresentou melhor potencial inibidor da enzima. Porém durante os testes com o spray observou-se que somente o Linalol não mata os mosquitos, eles acabam recuperando-se após 24 horas (entrada 5, Tabela 16).

Então foi avaliada a interação da mistura em duas concentrações diferentes com a EST- α (Figura 23).

FIGURA 23 – Toxicidade aguda após a aplicação do Linalol/PN com o controle através da atividade enzimática das enzimas esterase alfa (EST- α).



2 x Linalol/PN dobro da concentração. Os resultados expressam média da atividade enzimática \pm erro padrão (n = 30 para cada grupo) (foi utilizado ANOVA - one way e os contrastes de Tukey) Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$. FONTE: o autor (2017)

Os resultados indicam que quando os mosquitos são expostos cronicamente à mistura Linalol/PN ocorre um aumento na atividade das enzimas EST- α , quando comparado ao controle.

Os resultados dos testes enzimáticos realizados até o momento não permitem concluir qual o mecanismo de ação da mistura que se mostrou com forte atividade adulticida. Novos ensaios enzimáticos deverão ser realizados para buscar compreender o mecanismo de ação desta mistura frente ao mosquito *A. aegypti*.

3.3.6 Ensaios enzimáticos realizados em biorreatores

Quando se tem um grande número de compostos para realização de ensaio enzimáticos, a busca por metodologias mais rápidas, simples, baratas e confiáveis para a triagem e identificação de inibidores da acetilcolinesterase se faz necessário. Uma alternativa é a imobilização da enzima alvo em um sistema cromatográfico. Este

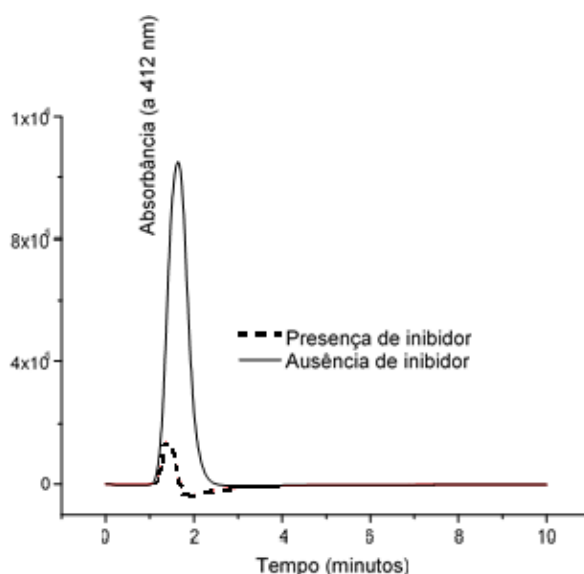
método reduz o tempo de análise e dá origem resultados mais confiáveis, fornecendo um aumento na quantidade de informação sobre a afinidade da molécula com a enzima alvo (DA SILVA et al., 2013).

Devido às suas características, a técnica de ensaio em biorreatores aumenta a precisão e a reprodutibilidade, minimizando custos de análise e o tempo em comparação com os ensaios envolvendo métodos tradicionais. A imobilização de enzimas é feita diretamente sobre a superfície interna de um capilar de tubo aberto o que facilita a injeção da amostra e o tampão para renovação do material suportado (DA SILVA et al., 2013).

As amostras foram submetidas a ensaios anti-colinesterásicos com as enzimas acetilcolinesterase de enguia elétrica (ICER-AChE-ee), de eritrócitos humanos (ICER-AChE-hu) e butirilcolinesterase de soro humano (ICER-BChE-hu).

O monitoramento do produto da reação enzimática foi feito pela observação da banda cromatográfica correspondente à formação do produto da reação enzimática, como por exemplo na Figura 24 segue o cromatograma representando a diminuição da banda cromatográfica referente ao produto na presença e ausência do inibidor padrão tacrina.

FIGURA 24 – Cromatograma ilustrando o decrescimento da atividade enzimática do ICER-AChE-ee na presença de inibidor padrão a $200 \mu\text{mol L}^{-1}$.



Os percentuais de inibição foram obtidos comparando-se a área da atividade da enzima na presença do inibidor (A_i) com a área da atividade da enzima na ausência de inibidor (A_0), de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{ de inibição} = \left[1 - \frac{A_i}{A_0} \right] \times 100$$

EQUAÇÃO 1 - Fórmula do cálculo percentuais de inibição

Os resultados obtidos dos ensaios anticolinesterásicos foram compilados na Tabela 17.

TABELA 17 – Resultados ensaios enzimáticos obtidos em biorreatores.

Compostos	% inibição ICER-AChE _{hu}	% inibição ICER-AChE _{ee}	% inibição ICER-BChE
Tacrina ¹	83,3	90,0	NC
Eserina ²	NC	NC	82,0
Linalol	8,68	7,12	9,94
PN	4,68	5,03	12,2
Linalol/PN	9,44	6,65	4,41
R-Linalol	7,39	4,05	6,52
R-Linalol/PN	6,91	3,25	4,12

¹ Inibidor padrão AChE; ² Inibidor padrão BChE. NC - Não calculado.

Esses resultados mostraram, uma vez mais, que nenhuma das substâncias quando testadas isoladamente ou a mistura Linalol/PN, ocorre a inativação da enzima AChE e neste caso também mostramos que não ocorre a inativação da enzima BChE.

3.4 TESTES PARA POTENCIALIZAR OS EFEITOS ADULTICIDAS EM SPRAY.

Durante os testes adulticidas foi observado que ao entrar em contato com o material aplicado por spray a maioria dos insetos não apresentava atividade de voo nos primeiros minutos de experimento, porém alguns permaneciam vivos movimentando-se no chão da gaiola. Outros insetos não apresentaram atividade de voo regular, sempre caindo no fundo da gaiola tentando voltar ao voo. Acredita-se que nas gaiolas os insetos são expostos a uma quantidade crônica dos compostos. Quando esta mesma quantidade de material entra em contato com os mosquitos em espaços maiores, os mosquitos tendem a voar para longe do local de aplicação buscando facilitar um processo de detoxificação, diminuindo a porcentagem de mortalidade.

Para evitar que isso aconteça novas formulações foram desenvolvidas em spray, Tabela 18, tentando facilitar as interações entre os compostos com atividade adulticida e os insetos. A Tabela 19 apresenta os resultados obtidos com sprays.

Após a aplicação do material observou-se que os insetos não apresentaram atividade de voo regular, sempre caindo no fundo da gaiola e mal conseguiam manter apoiados nas próprias pernas. Os melhores resultados foram observados quando aplicado o dobro da concentração de Linalol/PN (entrada B) e para as entradas AR4 e 5, quando foi realizado teste com um terceiro material denominado PN 2. Novos testes serão realizados para avaliar a atividade destes materiais em espaços maiores para obtermos respostas mais próximas da realidade.

3.5 UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) PARA AVALIAÇÃO DOS VOLÁTEIS

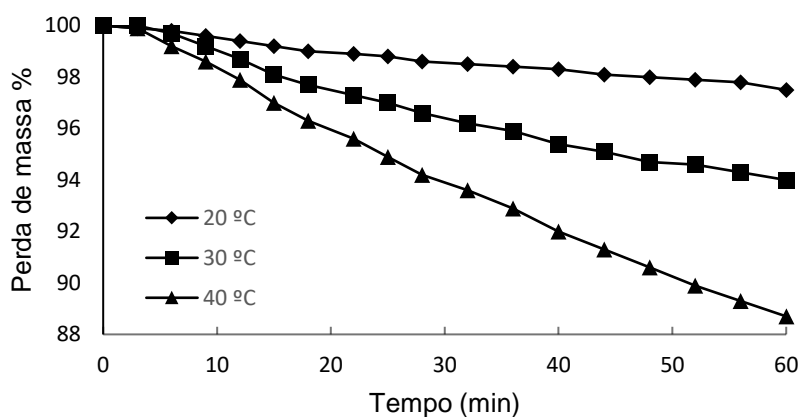
Durante os testes iniciais em que foi verificado o efeito de repelência dos compostos de interesse aplicados na mão do experimentador, observou-se a mortalidade acentuada de mosquitos causada pela combinação de duas substâncias em particular, o Linalol e o PN. O insucesso obtido na tentativa de reproduzir esse efeito quando os compostos foram acondicionados em spray, visando uma possível aplicação industrial desse resultado, nos levou a especular porque a mistura tem uma boa eficiência quando aplicado na mão e porque esse efeito não é observado quando se utiliza essa mistura em spray.

Para isso utilizou-se a técnica de TGA para verificar a variação da massa em função da temperatura e do tempo em um ambiente de temperatura e atmosfera controladas. A Tabela 20 mostra a variação da massa (porcentagem) em relação à temperatura após 60 minutos de teste. A Figura 25 apresenta os resultados obtidos para o Linalol.

TABELA 20 – Variação da massa em função da temperatura para o Linalol individualmente depois de 60 minutos.

Temperatura (°C)	Massa Residual
20	97,79 %
30	95,71 %
40	89,68 %

FIGURA 25 – Análise termogravimétrica do Linalol para verificar a variação da massa em função da temperatura em um tempo de 60 minutos.



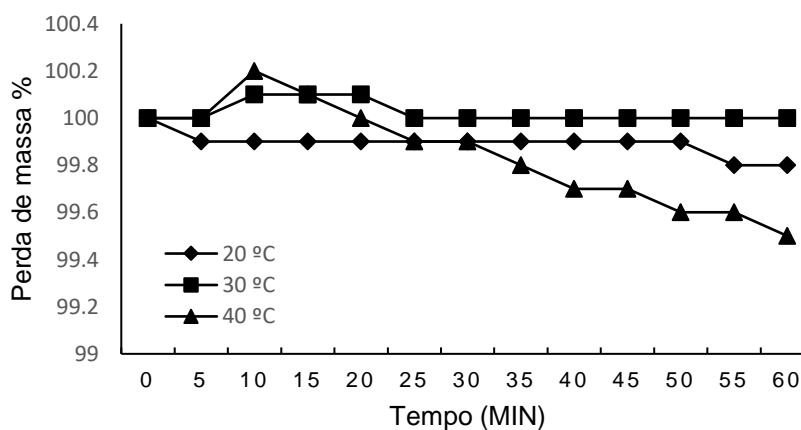
Para o Linalol pode-se observar uma perda maior de massa (89,68 %), após 60 minutos de teste, quando se emprega temperatura de 40 °C.

A Tabela 21 mostra a variação da massa (%) em relação da temperatura após 60 minutos de teste para o PN. A Figura 26 apresenta os resultados obtidos para o composto.

TABELA 21 – Variação da massa em função da temperatura para o PN individualmente depois de 60 minutos.

Temperatura (°C)	Massa Residual
20	97,87 %
30	100 %
40	99,87 %

FIGURA 26 – Análise termogravimétrica do PN para verificar a variação da massa em função da temperatura em um tempo de 60 minutos.



Para o PN pode-se observar uma pequena perda de massa, após 60 minutos de testes, mesmo elevando-se a temperatura até 40 °C, o que está relacionado ao

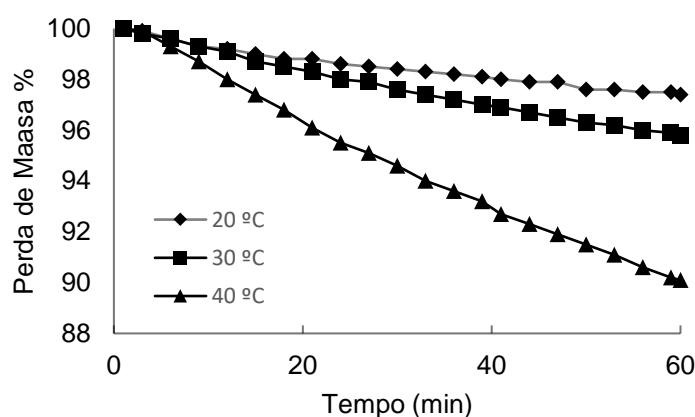
maior ponto de ebulição dessa substância quando comparado com o do Linalol. Esse resultado pode ser explicado pelo fato das interações intermoleculares nessa substância serem mais fortes do que para o linalol.

A Tabela 22 mostra a variação da massa em relação à temperatura após 60 minutos de teste para a mistura Linalol/PN. A Figura 27 apresenta os resultados obtidos para a mistura.

TABELA 22 – Variação da massa em função da temperatura para o a mistura Linalol/PN depois de 60 minutos.

Temperatura (°C)	Massa Residual
20	97,75 %
30	95,76 %
40	90,01 %

FIGURA 27 – Análise termogravimétrica da mistura Linalol/PN para verificar a variação da massa em função da temperatura em um tempo de 60 minutos.



Para a mistura pode-se observar uma perda de massa mais próxima a que ocorreu para o Linalol, após 60 minutos de testes. Esses resultados nos indicam que a relação dos compostos que volatilizam da mão do experimentador e passam a ocupar a atmosfera no interior das gaiolas onde os mosquitos são confinados, não deve ser a mesma da aplicada na mão do experimentador. Esse fato pode explicar a não reprodutibilidade dos resultados dos testes realizados em gaiola expondo os mosquitos aos compostos que exalam da mão do experimentador ou tratando-os com o spray da mistura dos compostos. Outro fator agravante consiste no fato de que quando os mosquitos são ensaiados no interior da gaiola com qualquer que seja a mistura dos compostos eles não têm opção de fuga e quando são tratados com essa mistura no ambiente eles podem fugir dessa atmosfera com possível efeito adúlticida

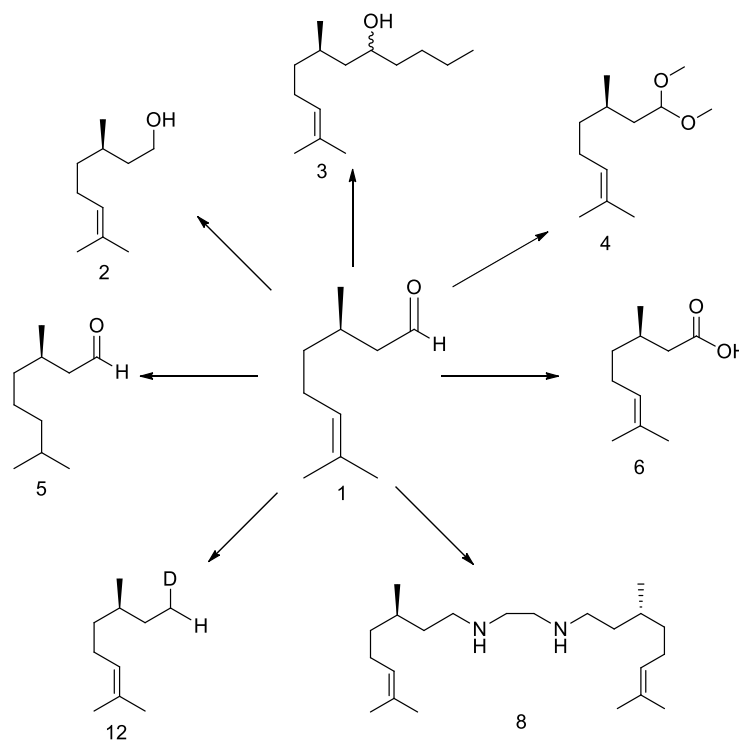
voando para longe dela e esperando que suas enzimas atuem destruindo os compostos que causam algum efeito deletério ao mosquito. Desta forma, deve-se trabalhar no sentido de potencializar o efeito adúlticida da mistura Linalol/PN combinando com outras substâncias que apresentem maior letalidade ao mosquito.

3.6 SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS CANDIDATOS A REPELENTES

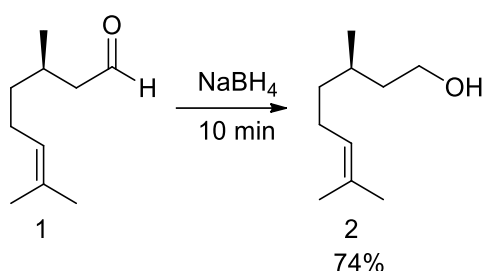
3.6.1 Reações de derivatização do citronelal

O citronelal é um monoterpenoide, sendo o principal componente na mistura dos compostos químicos presentes no óleo de citronela, o que lhe confere seu odor característico e seu efeito de repelência a mosquitos, entre eles o *A. aegypti*. O citronelal possui um potencial repelente já descrito na literatura (MÜLLER et al., 2008; POHLIT et al., 2011; SPECOS et al., 2010; YOON et al., 2015), porém devido ao seu odor característico muito forte e seu baixo poder residual de repelência ele tem seu uso reduzido. Nesse sentido algumas variações estruturais foram realizadas com o citronelal buscando aumentar sua atividade de repelência, diminuindo seu cheiro. A Figura 28 apresenta algumas transformações efetuadas a partir do citronelal.

FIGURA 28 – Síntese de derivados do citronelal.



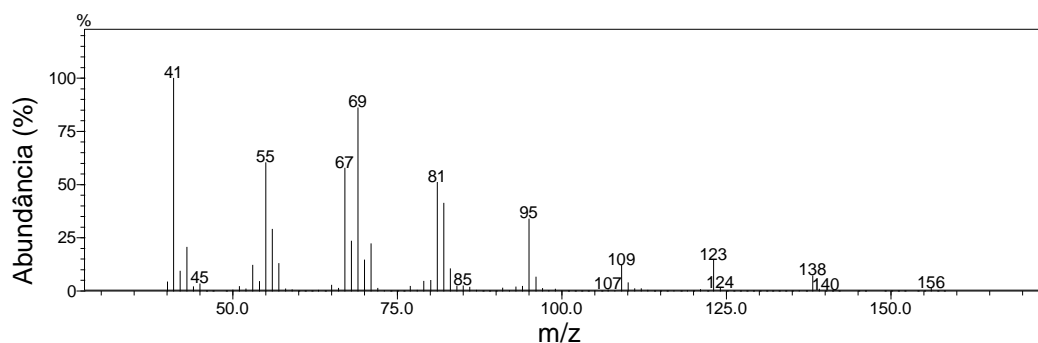
Entre as possíveis transformações visualizadas a partir do citronelal vislumbrou-se sua transformação em álcoois tendo em vista que o *p*-mentano-3,8-diol já é descrito com atividade repelente (DRAPEAU et al., 2011). Outro exemplo é o citronelol um monoterprenoide constituinte de óleos com atividade repelente (PETER; MWANGI, 2014; TISGRATOG et al., 2016; ZOUBIRI; BAALIOUAMER, 2014) e que possui um odor mais agradável comparado com o do citronelal. A reação para obtenção do citronelol consiste em utilizar um agente redutor, como o borohidreto de sódio, que leva a formação de um álcool primário.



Optou-se por realizar a redução do citronelal em almofariz, sem solvente, seguindo a metodologia descrita por (CHO et al., 2006). Após 10 minutos de maceração a análise via cromatografia em delgada (CCD) revelou a ausência de material de partida, que após extração levou à formação do citronelol em 75 % de rendimento.

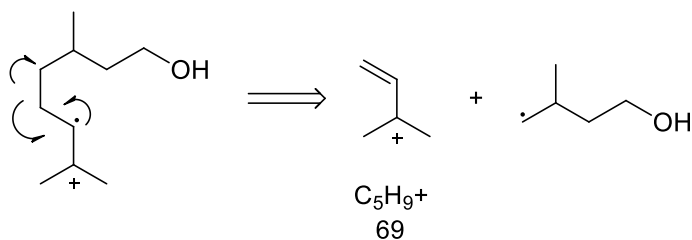
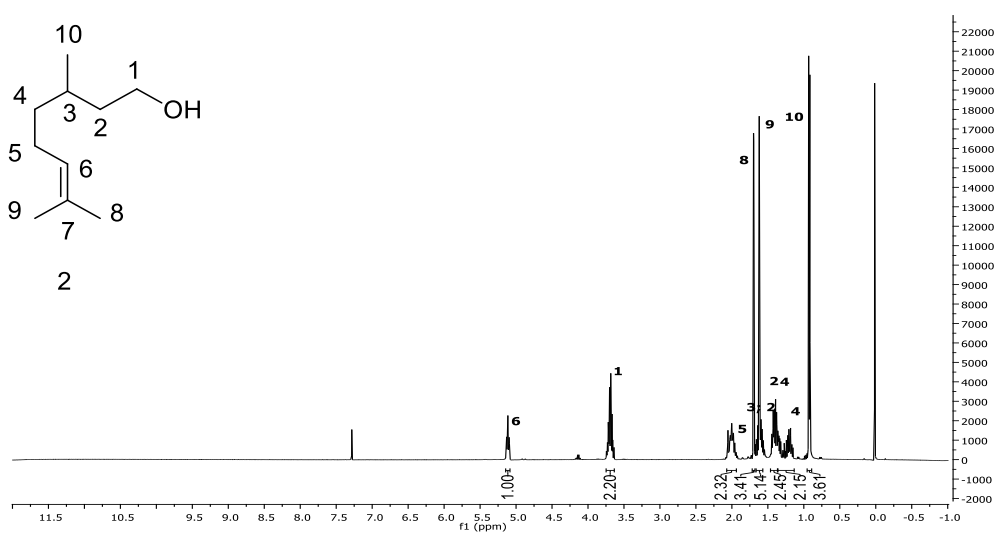
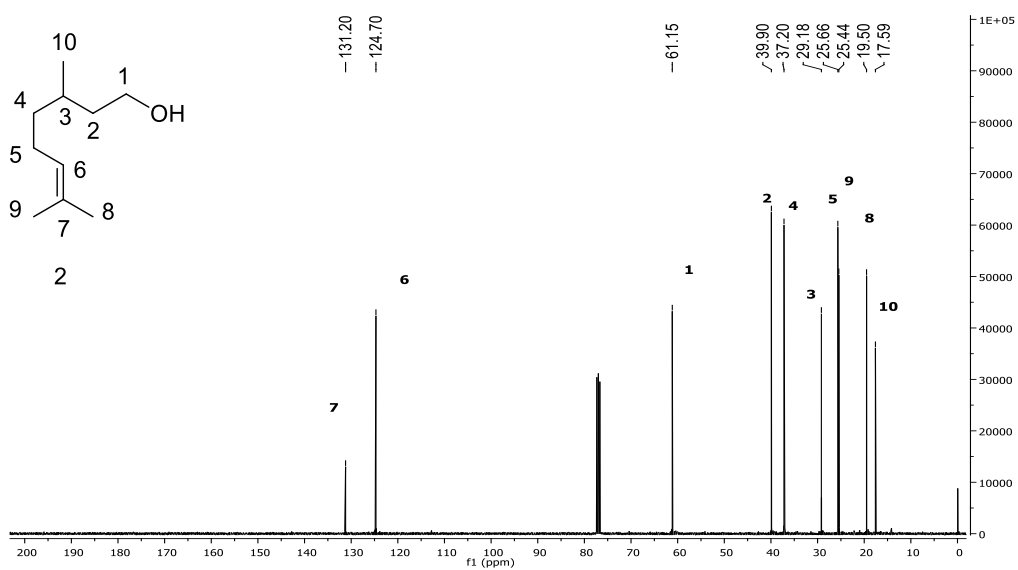
O produto foi purificado e analisado via cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) (Figura 29) e por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono (RMN de ¹H e por RMN de ¹³C) (Figura 30 e 31).

FIGURA 29 – Espectro de fragmentação de massas do citronelol.



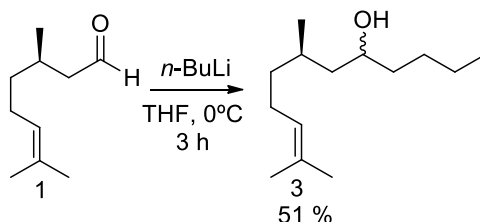
Para compostos dessa natureza observa-se a quebra de ligação carbono-carbono vizinho a dupla ligação. Com formação do radical alila, o que corresponde a perda do fragmento [C₅H₉]⁺, que torna-se o pico *m/z* = 69 (esquema 3).

ESQUEMA 3 – Fragmentação da molécula do citrônolol.

FIGURA 30 – Espectro de RMN de ^1H do citrônolol.FIGURA 31 – Espectro de RMN de ^{13}C do citrônolol.

No espectro de RMN de ^1H do citronelol (Figura 30) percebeu-se ausência de sinais na região entre δ 9,0 e 10,0 ppm referente ao hidrogênio da carbonila do citronelal, também pode-se observar a presença de um sinal em δ 3,69 ppm com integral para 2 hidrogênios, referente aos hidrogênios conectados ao carbono 1. No espectro de RMN de ^{13}C pode-se destacar os deslocamentos químicos dos carbonos 1 e 2 em δ 61,2 e δ 39,9 ppm, respectivamente (Figura 31).

Para a obtenção do 7,11-dimetildodeca-10-en-5-ol realizou-se a reação de adição do *n*-butil lítio ao citronelal em THF. A intenção de sintetizar este material foi para verificar se um álcool secundário com cadeia carbônica mais longa possui boa atividade repelente.



O produto foi purificado e analisado via cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) verificou-se no cromatograma a presença de dois sinais com intensidade similares Figura 32.

Tal fato era esperado, visto que o material de partida já possui um centro estereogênico definido e a adição de butil lítio à aldeídos leva a formação de um novo centro, porém como não ocorre estereoseletividade obtêm-se a mistura racêmica dessa adição, gerando um par de diastereoisômeros conforme mostra a Figura 33.

FIGURA 32 – Cromatograma expandido da reação para obtenção do 7,11-dimetildodeca-10-en-5-ol.

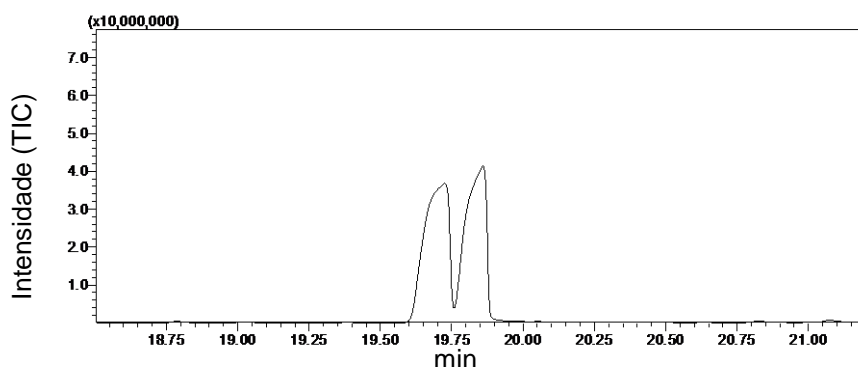
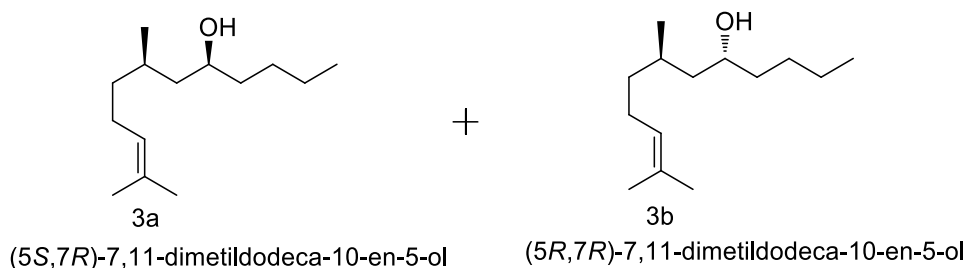


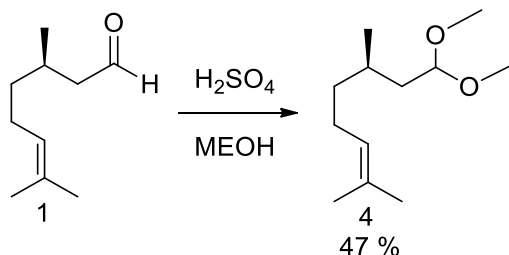
FIGURA 33 – Estrutura dos diastereoisômeros do 7,11-dimetildodeca-10-en-5-ol.



Então a mistura dos diastereoisômeros foi analisada via cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e infravermelho (anexo pág. 85) e por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono (RMN de ^1H e por RMN de ^{13}C) (anexo pág. 86).

No espectro de RMN de ^1H observa-se ausência de sinais na região entre δ 9,0 e 10,0 ppm referente ao hidrogênio da carbonila da função aldeído do citronelal, podendo destacar a presença de um sinal na região de δ 3,7 ppm, com integral para 1H referente ao hidrogênio ligado ao carbono 5, conectado à hidroxila. No espectro de RMN de ^{13}C é possível observar a ausência de sinal na região de 200 ppm referente a carbonila de aldeído, com aparecimento do carbono conectado com a hidroxila com deslocamento químico de δ 70 ppm.

Uma outra substância sintetizada a partir do citronelal foi seu acetal, obtido da reação com metanol, tendo em vista que seria mantido o estado de oxidação no carbono, ao mesmo tempo que se aumenta o ponto de ebulição. Os aldeídos reagem reversivelmente com dois equivalentes de um álcool na presença de um catalisador ácido para formar os acetais, estes são bons grupos protetores para carbonilas. A reação para obtenção do 8,8-dimetoxi-2,6-dimetiloct-2-eno foi a partir da mistura do citronelal com o ácido sulfúrico em metanol.



O produto foi purificado e analisado via cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) (anexo pág. 87) e por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono (RMN de ^1H e por RMN de ^{13}C) (anexo pág. 88).

No espectro de RMN de ^1H , os sinais mais importantes que evidenciam a formação do acetal foram os dois simpletos com deslocamento químico de δ 3,32 e 3,33 ppm com integral para 3H cada um atribuído aos hidrogênios metílicos e o sinal em δ 4,4 ppm referente ao hidrogênio do carbono acetálico. No espectro de RMN de ^{13}C é possível observar dois sinais com deslocamento químico de δ 52,2 e 52,7 ppm atribuídos aos carbonos metílicos e também um sinal com deslocamento químico de δ 103,3 ppm do carbono acetálico.

Compostos nitrogenados já são descritos com atividade repelente, como é o caso do DEET, da Icaridina e do IR3535. Porém compostos nitrogenados derivados da citronela com atividade repelente não foram encontrados na literatura.

Primeiramente tentou-se a obtenção de uma aldimina através da reação do citronelal com hidróxido de amônio. Após inúmeras tentativas, com a variação do tempo de reação, temperatura e quantidade dos reagentes, obteve-se uma mistura de produtos os quais não foi possível a separação e caracterização.

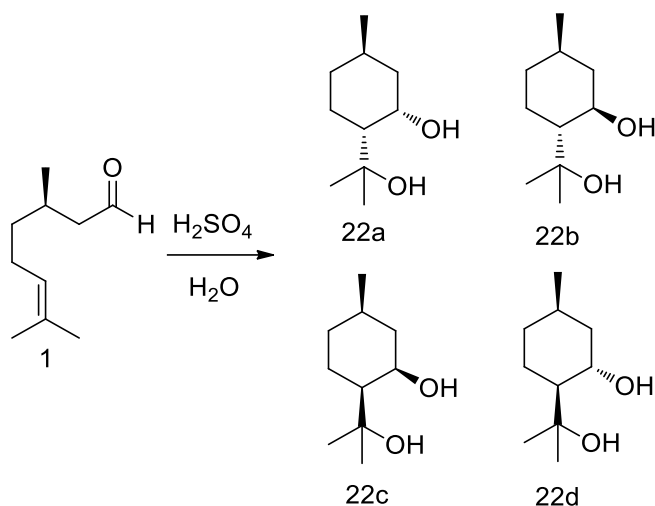
Outra reação foi a do citronelal com etilenodiamina que levou a formação do N1, N3-*bis*(3,7-dimetiloct-6-en-1-il)etano-1,2-diamina como um produto majoritário. O produto da reação foi analisado via cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) (anexo pág. 93) e por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono (RMN de ^1H e por RMN de ^{13}C) (anexo pág. 94).

No espectro de RMN de ^1H , os sinais mais importantes que evidenciam a formação do produto são os sinais na região de δ 2,68 ppm com integral para 8H atribuído aos hidrogênios 1 e 11, respectivamente, conectados ao nitrogênio (anexo pág. 94). No espectro de RMN de ^{13}C é possível observar dois sinais com deslocamento químico de δ 47 e 48 ppm referente aos carbonos conectados ao nitrogênio.

Uma das estratégias de sínteses foi a busca por compostos que se assemelham com a estrutura do *p*-mentano-3,8-diol, repelente com atividade já descrita na literatura. A reação de Prins é uma reação bem descrita para o estudo da catálise ácida. A protonação do grupo carbonilo resulta na síntese de diferentes isômeros do isopulegol a fração de alceno pode atacar o grupo carbonilo ativado através de várias conformações reativas (Figura 34)(HAMMER et al., 2014). Entretanto uma desvantagem desta síntese a partir do (*R*)-citraonal é a formação de isômeros (YUASA, 2000). A mistura de isômeros não apresenta um bom tempo de

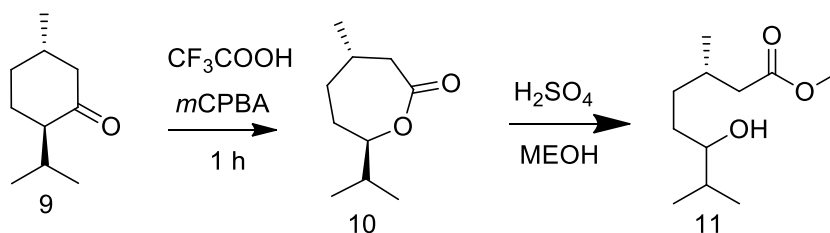
repelência, porém quando testados um par dos seus enantiômeros observa-se um aumento considerável no tempo de repelência.

FIGURA 34 – Síntese do *p*-mentano-3,8-diol a partir do citronelal.



Buscando avaliar a influência de oxidações introduzidas em esqueleto semelhante ao do *p*-mentano-3,8-diol na repelência das substâncias, as transformações abaixo, Figura 35, foram efetuadas a partir da mentona.

FIGURA 35 – Síntese de derivados da Mentona.



3.6.2 Testes de repelência com aplicação das substâncias derivadas do citronelal na mão

As substâncias sintetizadas bem com o citronelal sem derivatização foram aplicados na mão do avaliador para se determinar o efeito de repelência. Nestes testes utilizou-se como critério para a interrupção do bioensaio o tempo máximo para ocorrer duas picadas. Foi utilizado 100 μL do material em 1,0 mL de etanol. Foram utilizadas 30 fêmeas copuladas do mosquito em cada teste. A Tabela 23 apresenta os resultados de repelência com as substâncias sintetizadas e do (*R*)-citronelal.

TABELA 23 – Testes de repelência com fêmeas do *Aedes aegypti* (n = 20) com as substâncias sintetizadas em laboratório.

	Substância	Tempo término
1	(<i>R</i>)-Citronelal	35 min
2	Citronelol	28 min
3	7,11-dimetildodeca-10-en-5-ol	30 min
4	8,8-dimetoxi-2,6-dimetiloct-2-eno	17 min
5	3,7 dimetiloctanal	27 min
6	N1, N3- <i>bis</i> (3,7-dimetiloct-6-en-1-il)etano-1,2-diamina	3 min
7	(4 <i>S</i> ,7 <i>R</i>)-7-isopropil-4-metiloxepan-2-ona	15 min
8	(3 <i>S</i>)-metil 6-hidroxi-3,7-dimetiloctanoato	1 h 15 min
9	Ácido citronélico	1 h 45 min
10	(<i>R</i>)-Citronelal (transformação D)	2 h 30 min

Para as entradas de 2 a 7 não foi observado boa eficiência durante os testes de repelência. Vale ressaltar que para a entrada 6 foi observada uma diminuição drástica na atividade repelente, isso pode ter ocorrido pelo fato das substâncias possuir massa molecular mais elevada dificultando a capacidade de volatilização aliado ao provável fato de apresentar menor interação com os receptores do mosquito devido à grande variação estrutural efetuada na molécula.

Para as entradas 8, 9 e 10 observou-se um acréscimo significativo no tempo de repelência do derivado do citronelal. Tendo em vista este resultado, novas sínteses foram realizadas utilizando substâncias que apresentam carbonilas de aldeído ou cetona em suas estruturas, visando potencializar seus efeitos de repelência já descritos em literatura. Esta estratégia foi adotada para verificar se a função D teria a capacidade de potencializar o efeito de repelência destas substâncias. A Tabela 24 apresenta os resultados de repelência com as substâncias sintetizadas e de seus respectivos precursores.

TABELA 24 – Testes de repelência com fêmeas do *Aedes aegypti* (n = 20) com as substâncias sintetizadas em laboratório e os respectivos precursores.

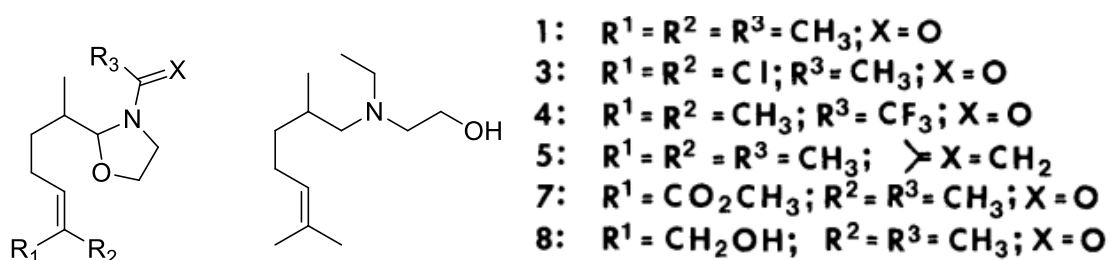
	Substância	Tempo término
1	Citral	37 minutos
2	Citral (transformação D)	1 hora 20 minutos
3	Mentona	50 minutos
4	Mentona (transformação D)	40 minutos
5	Carvona	42 minutos
6	Carvona (transformação D)	38 minutos
7	Cânfora	15 minutos
8	Cânfora (transformação D)	2 horas 30 minutos
9	Cinamaldeído	1 hora
10	Cinamaldeído (transformação D)	5 minutos
11	Undecanona	15 minutos
12	Undecanona (transformação D)	40 minutos
13	<i>m</i> -tolualdeído	15 minutos
14	<i>m</i> -tolualdeído (transformação D)	43 minutos
15	Terpeno enantiômero 1	40 minutos
16	Terpeno enantiômero 1 (transformação D)	5 horas 30 minutos
17	Terpeno enantiômero 2	20 minutos
18	Terpeno enantiômero 2 (transformação D)	1 hora
19	Mistura racêmica terpeno (transformação D)	1 hora

Os resultados da Tabela 24 revelam que os derivados do citral e da cânfora, entradas (entradas 1 e 2; 7 e 8) apresentaram um incremento significativo na atividade de repelência, a exemplo do que foi observado para o derivado do citronelal. No entanto, o melhor resultado de repelência observado entre todos os derivados sintetizados envolve o terpeno enantiômero 1 (entradas 15 e 16) em que o tempo de repelência passou de 40 minutos no caso do terpeno 1 para 5h e 30 minutos para seu derivado. Mais interessante ainda foi o resultado obtido com o enantiômero do terpeno 1, terpeno enantiômero 2 que apresentou tempo de repelência de 20 minutos e o seu derivado D apresentou tempo de repelência de 1 h. Embora a transformação tenha aumentado o tempo de repelência do terpeno enantiômero 2 a eficiência dele foi muito menor que a apresentada pelo terpeno enantiômero 1, demonstrando que a atividade de

repelência depende não apenas do esqueleto carbônico e das funções presentes na estrutura da substância mas de sua estereoquímica absoluta.

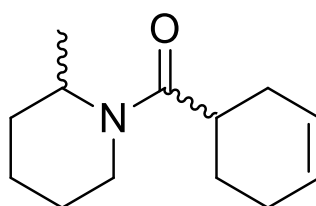
Poucos trabalhos descritos em literatura estudam o efeito de repelência sendo dependente da estereoquímica de uma substância. Um exemplo foi o trabalho de Taylor e Schreck 1984, onde foram obtidas quatorze misturas estereoisoméricas de seis hetero-ciclos de oxazolidina e um amino-álcool a partir de amostras comerciais de citronelol e avaliadas como repelentes de mosquitos (Figura 36). Os autores concluíram que algumas modificações estruturais diminuíram a atividade repelente e correlações fortes entre repelência e estereoquímica estavam geralmente ausentes (TAYLOR; NAKASHIMA, 1984).

FIGURA 36 – Estruturas geral do hetero-ciclos de oxazolidina e do amino-álcool.



Em outro trabalho Klun *et al.* 2001, utilizou a substância derivada da piperidina, Figura 37, com dois estereocentros e o racemato consiste em quatro estereoisômeros. Os bioensaios quantitativos de mosquitos usando *A. aegypti* mostraram que as configurações (1*S*, 2*S*) e (1*R*, 2*S*) foram 2,8-3,1 e 1,6-1,8 vezes mais efetivas, respectivamente, do que os outros dois estereoisômeros (1*R*, 2*R* e 1*S*, 2*R*) na redução de picadas de mosquito sendo que o (1*S*, 2*S*) foi 2,5 mais repelente do que o racemato (KLUN, 2001).

FIGURA 37 – Estrutura racêmica do ciclohex-3-en-1-il(2-metilpiperidin-1-il)metanona.



4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados permitiram identificar um novo complexo sintético foto estável com boa ação larvicida frente a *A. aegypti*. Esse resultado abre boas perspectivas visando o desenvolvimento de novos larvicidas.

Os estudos enzimáticos realizados em laboratório até o momento indicam que a atividade larvicida observada para o complexo *fac-4meim* não envolve a inibição da enzima AChE.

Os testes aduicidas em papel filtro mostraram que embora algumas das substâncias utilizadas tenham apresentado efeito de “*knockdown*”, semelhante ao apresentado pela piretrina II, seus efeitos aduicidas foram reduzidos.

Durante a avaliação da atividade aduicida utilizando a mistura das substâncias em frascos aerossóis, foi possível mostrar que apenas a adição de eugenol à mistura foi capaz de potencializar o efeito aduicida.

Nos testes aduicidas uma nova composição testada contendo uma substância adjuvante levou à mortalidade de todos os mosquitos usados nos bioensaios, com queda imediata dos mesmos. Esse resultado abre perspectiva para o desenvolvimento de uma mistura com forte atividade aduicida, baseada em produtos naturais, que pode servir de alternativa aos piretroides atualmente em uso para tal finalidade e que devem ser retirados do mercado.

Os resultados dos estudos enzimáticos realizados com mosquitos *A. aegypti* em laboratório nos bioensaios com os aerossóis, mostraram que o mecanismo de ação da mistura Linalol/PN nos mosquitos não os leva à morte pela interação com as enzimas AChE, BChE e EST- α .

Através das variações das estruturas realizadas no citronelal, foi possível obter um derivado com cheiro mais agradável e melhor ação repelente. Essa transformação, quando testada para um monoterpene em especial, levou à obtenção de uma substância com elevado poder de repelência, mais de cinco horas, e com cheiro ainda mais agradável que o derivado do citronelal. Essa substância apresenta a vantagem de ser sintetizada em uma única etapa através de uma reação em que os preceitos da química verde são respeitados, podendo se constituir em alternativa viável para a produção em grande escala de produtos com efeito repelente.

Vale a pena ressaltar que nesse trabalho foi verificado uma forte relação entre a estereoquímica e a atividade repelente da transformação do terpeno enântiômero 1 com potencial para ser usada comercialmente.

4.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sintetizar novos complexos, determinar suas atividades larvicidas e investigar seus mecanismos de ações visando potencializar a ação larvicida.

Utilizar do composto com ação larvicida para o controle de outras pragas florestais e agrícolas, tendo em vista que resultados promissores já estão sendo obtidos em estudos preliminares.

Estudos visando determinar a aplicabilidade da mistura dos compostos naturais para o desenvolvimento de um novo adulticida frente a *A. aegypti*.

Estudo do mecanismo de ação da mistura de produtos naturais com efeito adulticida.

Utilização da mistura de produtos naturais com efeito adulticida para o controle de outras pragas tendo em vista os resultados promissores observados em estudos preliminares.

Síntese e formulação de novos repelentes visando aumentar o tempo de proteção contra o mosquito *A. aegypti*.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, H. R. C. et al. *Aedes aegypti* Control Strategies in Brazil: Incorporation of New Technologies to Overcome the Persistence of Dengue Epidemics. **Insects**, v. 6, n. 2, p. 576–594, 2015.

BALDACCHINO, F. et al. Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review. **Pest Management Science**, v. 71, n. 11, p. 1471–1485, 2015.

BANGS, M. J. et al. Detection of Dengue Viral RNA in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Exposed to Sticky Lures Using Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction. **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 5, p. 720–724, 2001.

BARLOW, F. et al. Insecticidal activity of the pyrethrins and related compounds IV. Essential features for insecticidal activity in chrysanthemates and related cyclopropane esters. **Pesticide Science**, v. 2, n. 3, p. 115–118, 1971.

BARREIRO, E. J.; FERREIRA, V. F.; COSTA, P. R. R. SUBSTÂNCIAS ENANTIOMERICAMENTE PURAS (SEP): A QUESTÃO DOS FÁRMACOS QUIRAIS Eliezer. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 647–656, dez. 1997.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 25 abr. 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 2, p. 248–254, 1976.

BRADY, O. J. et al. Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, 2012.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007.

BRIGGS, G. G. et al. Structural aspects of the knockdown of pyrethroid. **Pesticide Science**, v. 5, n. 5, p. 643–649, 1974.

BRIGGS, G. G. et al. Insecticidal activity of the pyrethrins and related compounds VIII. Relation of polarity with activity in pyrethroids. **Pesticide Science**, v. 7, n. 3, p. 236–240, 1976.

CANTRELL, C. L.; DAYAN, F. E.; DUKE, S. O. Natural products as sources for new pesticides. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 6, p. 1231–1242, 2012.

CARVALHO, S. E. S. et al. Comparative analysis of American Dengue virus

type 1 full-genome sequences. **Virus Genes**, v. 40, n. 1, p. 60–66, 2009.

CECILIA BOMBELLI, § et al. Concentration as the Switch for Chiral Recognition in Biomembrane Models. 2008.

CHO, B. T. et al. Solvent-free reduction of aldehydes and ketones using solid acid-activated sodium borohydride. **Tetrahedron**, v. 62, n. 34, p. 8164–8168, 2006.

CORRÊA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: Revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 4, p. 500–506, 2011.

CUNH, I. B. S. Piretroides como uma classe de inseticidas Aplicacao desenvolvimento químico e perspectivas. **Quimica Nova**, v. 12, n. 3, p. 272–281, 1989.

D'AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (Dicloro difenil tricloroetano): Toxicidade e contaminação ambiental - Uma revisão. **Quimica Nova**, v. 25, n. 6 A, p. 995–1002, 2002.

DA SILVA, H. H.; DA SILVA, I. G. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 4, p. 349–355, 1999.

DA SILVA, J. I. et al. Acetylcholinesterase capillary enzyme reactor for screening and characterization of selective inhibitors. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 73, p. 44–52, 2013.

DAMBOLENA, J. S. et al. Effects of menthol stereoisomers on the growth, sporulation and fumonisin B1 production of *Fusarium verticillioides*. **Food Chemistry**, v. 123, n. 1, p. 165–170, 2010.

DIAZ, J. H. Chemical and plant-based insect repellents: Efficacy, safety, and toxicity. **Wilderness and Environmental Medicine**, v. 27, n. 1, p. 153–163, 2016.

DRAPEAU, J. et al. Green synthesis of para-Menthane-3,8-diol from *Eucalyptus citriodora*: Application for repellent products. **Comptes Rendus Chimie**, v. 14, n. 7–8, p. 629–635, 2011.

DUPONT-ROUZEYROL, M. et al. Chikungunya virus and the mosquito vector *Aedes aegypti* in New Caledonia (South Pacific Region). **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 12, n. 12, p. 1036–41, 2012.

ELLIOTT, M. Progress in the design of insecticides. **Chemical Industries**, n. 17, p. 757–769, 1979.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.

ERNST, K. C. et al. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Longevity and Differential Emergence of Dengue Fever in Two Cities in Sonora, Mexico. **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 1, p. 204–211, jan. 2017.

FINEFIELD, J. M. et al. Enantiomeric natural products: Occurrence and biogenesis. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 51, n. 20, p. 4802–4836, 2012.

FUJIOKA, H. et al. A mild and efficient one-pot synthesis of 2-dihydroimidazoles from aldehydes. **Tetrahedron Letters**, v. 46, n. 13, p. 2197–2199, 2005.

GALEOTTI, N. et al. Menthol: a natural analgesic compound. **Neuroscience Letters**, v. 322, n. 3, p. 145–148, 2002.

GUBLER, D. J. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 319–330, set. 2004.

HAMMER, S. C. et al. Squalene hopene cyclases are protonases for stereoselective Brønsted acid catalysis. **Nature Chemical Biology**, v. 11, n. february, p. 121–128, 2014.

HENRIQUE, M.; PAIVA, S. **Caracterização molecular da resistência a inseticidas químicos em populações de Aedes aegypti**. [s.l.] Fundação Oswaldo Cruz, 2013.

HERETSCH, P.; RABE, S.; GIANNIS, A. Synthesis of all diastereomers of the piperidine--alkaloid substructure of cyclopamine. **Organic letters**, v. 11, n. 23, p. 5410–5412, 2009.

HIRATA, R. **Piretróides: Estrutura Química-Atividade Biológica** Química Nova, 1995.

IGNAZ J. BUERGE, * et al. Enantioselective Degradation of Metalaxyl in Soils: Chiral Preference Changes with Soil pH. 2003.

IMFELD, G. et al. Monitoring and assessing processes of organic chemicals removal in constructed wetlands. **Chemosphere**, v. 74, n. 3, p. 349–362, 2009.

ISHMURATOV, G. Y. et al. Low-temperature reduction of acyclic (–)-mentholactone derivatives with diisobutylaluminum hydride in methylene chloride. **Russian Journal of Organic Chemistry**, v. 51, n. 7, p. 947–950, 2015.

KAIN, P. et al. Odour receptors and neurons for DEET and new insect repellents. **Nature**, v. 502, n. 7472, p. 507–512, 2013.

KAMATOU, G. P. P. et al. Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties. **Phytochemistry**, v. 96, p. 15–25, 2013.

KIESSWETTER, A. M. AND R. Unequal Activities of Enantiomers via Biological Receptors: examples of chiral drug, pesticide, and fragrance molecules. **Journal of Chemical Education**, v. 84, n. 12, p. 2013–2018, 2007.

KLUN, J. A.; SCHMIDT, W. F.; DEBBOUN, M. Stereochemical Effects in an Insect Repellent. **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 6, p. 809–812, 2001a.

KLUN, J. A.; SCHMIDT, W. F.; DEBBOUN, M. Stereochemical effects in an insect repellent. **Journal of medical entomology**, v. 38, n. 6, p. 809–812, 2001b.

KRASAVIN, M. Novel diversely substituted 1-heteroaryl-2-imidazolines for fragment-based drug discovery. **Tetrahedron Letters**, v. 53, n. 23, p. 2876–2880, 2012.

LAMBRECHTS, L.; SCOTT, T. W.; GUBLER, D. J. **Consequences of the Expanding Global Distribution of Aedes albopictus for Dengue Virus Transmission** (S. B. Halstead, Ed.) **PLoS Neglected Tropical Diseases** San Francisco, USA, maio 2010.

LAURA DE SENE AMÂNCIO ZARA, A. et al. Estratégias de controle do Aedes aegypti: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 1–2, 2016.

LIONETTO, M. G. et al. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in Mytilus galloprovincialis and Mullus barbatus in an Italian coastal marine area. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 3, p. 324–330, 2003.

MAIA, M. F.; MOORE, S. J. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. **Malaria Journal**, v. 10, n. Suppl 1, p. S11, 2011.

MALAVIGE, G. N. et al. Dengue viral infections. **Postgrad Med J**, v. 80, n. 948, p. 588–601, 2004.

MARELL, D. J. et al. Analysis of seven-membered lactones by computational nmr methods: Proton NMR chemical shift data are more discriminating than carbon. **Journal of Organic Chemistry**, v. 79, n. 2, p. 752–758, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Metodologia para Quantificação de Atividade de Enzimas Relacionadas com a Resistência a Inseticidas em Aedes aegypti**. [s.l: s.n.].

MONTELLA, I. R.; SCHAMA, R.; VALLE, D. The classification of esterases: An important gene family involved in insecticide resistance - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 437–449, 2012.

MORENO-MADRIÑÁN, M. J.; TURELL, M. Factors of Concern Regarding Zika and Other Aedes aegypti-Transmitted Viruses in the United States. **Journal of Medical Entomology**, v. 7, 2017.

MS/FUNASA. Controle de Vetores Procedimentos de Segurança. In: FUNASA, M. DA S.- (Ed.). . 1º ed. [s.l: s.n.]. p. 121.

MS/FUNASA. Dengue Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor. In: 3º ed. [s.l: s.n.].

MÜLLER, G. C. et al. Indoor protection against mosquito and sand fly bites: a comparison between citronella, linalool, and geraniol candles. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 24, p. 150–153, 2008.

NUCHUCHUA, O. et al. In vitro characterization and mosquito (Aedes aegypti) repellent activity of essential-oils-loaded nanoemulsions. **American Association of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 4, p. 1234–1242, 2009.

OLIVEIRA, B. R. DE. Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de Carapa guianensis e Copaifera sp. e estudo da ação repelente frente a Aedes aegypti. p. 128, 2008.

PAULA, J. P. et al. Atividade repelente do óleo essencial de Ocimum selloi Benth. (Variedade eugenol) contra o Anopheles braziliensis Chagas. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 376–378, 2004.

PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 174–187, 2015.

PETER, K.; MWANGI, R. W. Synergistic repellent activity of plant essential oils against Aedes aegypti on rabbit Skin. v. 1, n. 4, p. 55–59, 2014.

POHLIT, A. M. et al. Patent literature on mosquito repellent inventions which contain plant essential oils - A review. **Planta Medica**, v. 77, n. 6, p. 598–617, 2011.

PRUD'HOMME, S. M. et al. Impact of micropollutants on the life-history traits of the mosquito Aedes aegypti: On the relevance of transgenerational studies. **Environmental Pollution**, v. 220, p. 242–254, jan. 2017.

REGIS, L. N. et al. Sustained reduction of the dengue vector population resulting from an integrated control strategy applied in two Brazilian cities. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e67682, 3 jan. 2013.

REHMAN, J. U.; ALI, A.; KHAN, I. A. Plant based products: Use and development as repellents against mosquitoes: A review. **Fitoterapia**, v. 95, p. 65–74, 2014.

RODRIGUES, L. E. A. Reflexões Sobre O Metabolismo Biossintético Das Piretrinas. **Rev. ecotoxicol. e meio ambiente**, v. 20, p. 67–84, 2010.

SANTOS, S. R. L.; SILVA, V. B.; BARBOSA, J. D. F. of Phenylpropanoids , Terpenes , and Related Compounds. v. 10, n. 10, 2010.

SAWICKI, R. M. Insecticidal activity of pyrethrum extract and its four insecticidal constituents against house flies. III. Knock-down and recovery of flies treated with pyrethrum extract with and without piperonyl butoxide. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 13, n. 5, p. 283–292, 1962.

SHAALAN, E. A.-S. S. et al. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. **Environment International**, v. 31, n. 8, p. 1149–1166, 2005.

SILVA DE ASSIS, H. C. **Der einsatz von biomarkern zur summarischen erfassung vom gewässerverschmutzungen**. [s.l.] University of Berlin, 1998.

SPECOS, M. M. M. et al. **Microencapsulated citronella oil for mosquito repellent finishing of cotton textiles** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2010.

STYMIEST, J. L. et al. Enantiodivergent conversion of chiral secondary alcohols into tertiary alcohols. **Nature**, v. 456, n. 7223, p. 778–782, 11 dez. 2008.

TAKAHASHI, H.; IWASHIMA, M.; IGUCHI, K. Determination of absolute configurations of β - or γ -methyl substituted secondary alcohols by NMR spectroscopy. **Tetrahedron Letters**, v. 40, n. 2, p. 333–336, 1999.

TAWATSIN, A. et al. Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. **Journal of Vector Ecology**, v. 26, n. 1, p. 76–82, 2001.

TAYLOR, W. G.; NAKASHIMA, T. O. M. T. G. taylor. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 62, n. 1, p. 96–100, 1984.

TISGRATOG, R. et al. Plants traditionally used as mosquito repellents and the implication for their use in vector control. **Acta Tropica**, v. 157, p. 136–144, 2016.

TURNER, S. L. et al. Ultra-prolonged activation of CO₂-sensing neurons disorients mosquitoes. **Nature**, v. 474, n. 7349, p. 87–91, 2011.

VALLE, D. et al. Quantification methodology for enzyme activity related to insecticide resistance in *Aedes aegypti*. In: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ AND SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, M. DA S. (Ed.). . Rio de Janeiro and

Distrito Federal: [s.n.]. p. 129.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 390–400, 2003.

VIGILÂNCIA, S. DE. Epidemiológico. **Ministério da Saúde**, v. 47, p. 1–10, 2016.

VILELA, A. F. L. et al. Immobilized cholinesterases capillary reactors on-flow screening of selective inhibitors. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 968, p. 87–93, 2014.

WALIWITIYA, R. et al. Insecticidal Activity of Selected Monoterpenoids and Rosemary Oil to *Agriotes obscurus* (Coleoptera: Elateridae). **Journal of Economic Entomology**, v. 98, n. 5, p. 1560–1565, 2005.

WAQUIL, J. M. **Manejo integrado de pragas: revisão história e perspectivas**. Sete Lagoas, MG: [s.n.]. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/34902/1/Palestra-Manejo-integrado.pdf>>.

WHO. Dengue haemorrhagic fever: Diagnosis, treatment, prevention and control. p. 84, 1997.

WHO. Guidelines for Testing Mosquito Adulticides for Indoor Residual Spraying and Treatment of. p. 70, 2006.

WONG, S. S. Y.; POON, R. W. S.; WONG, S. C. Y. Zika virus infection-the next wave after dengue? **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 115, n. 4, p. 226–242, 2016.

YAZAR, K. et al. Preservatives and fragrances in selected consumer-available cosmetics and detergents. **Contact Dermatitis**, v. 64, n. 5, p. 265–272, 2011.

YOON, J. K. et al. Comparison of Repellency Effect of Mosquito Repellents for DEET, Citronella, and Fennel Oil. **Journal of Parasitology Research**, v. 2015, 2015.

YUASA, Y.; TSURUTA, H. . Y. Y. A practical and efficient synthesis of p-menthane-3,8-diol. **Organic Process Research & Development**, v. 4, n. 3, p. 159–169, 2000.

ZOUBIRI, S.; BAALIOUAMER, A. Potentiality of plants as source of insecticide principles. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 6, p. 925–938, 2014.

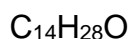
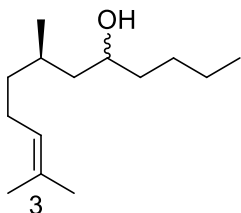
ANEXO

Figura 1 – Espectro de Fragmentação de massas do 7,11-dimetildodeca-10-en-5-ol.	85
Figura 2 – Espectro de infravermelho do 7,11-dimetildodeca-10-en-5-ol.	85
Figura 3 – Espectro de RMN de ^1H do 7,11-dimetildodeca-10-en-5-ol.	86
Figura 4 – Espectro de RMN de ^{13}C do 7,11-dimetildodeca-10-en-5-ol.	86
Figura 5 – Espectro de fragmentação de massas do 8,8-dimetoxi-2,6-dimetiloct-2-eno.	87
Figura 6 – Espectro de infravermelho do 8,8-dimetoxi-2,6-dimetiloct-2-eno.	87
Figura 7 – Espectro de RMN de ^1H do 8,8-dimetoxi-2,6-dimetiloct-2-eno.	88
Figura 8 – Espectro de RMN de ^{13}C do 8,8-dimetoxi-2,6-dimetiloct-2-eno.	88
Figura 9 – Espectro de fragmentação de massas do 3,7-dimetiloctanal.	89
Figura 10 – Espectro de infravermelho do 3,7-dimetiloctanal.	89
Figura 11 – Espectro de RMN de ^1H do 3,7-dimetiloctanal.	90
Figura 12 – Espectro de RMN de ^{13}C do 3,7-dimetiloctanal.	90
Figura 13 – Espectro de infravermelho do ácido citronílico.	91
Figura 14 – Espectro de RMN de ^1H do ácido citronílico.	92
Figura 15 – Espectro de RMN de ^{13}C do ácido citronílico.	92
Figura 16 – Espectro de fragmentação de massas do N1, N3- <i>bis</i> (3,7-dimetiloct-6-en-1-il)etano-1,2-diamina.	93
Figura 17 – Espectro de infravermelho do N1, N3- <i>bis</i> (3,7-dimetiloct-6-en-1-il)etano-1,2-diamina.	93
Figure 18 – Espectro de RMN de ^1H do N1, N3- <i>bis</i> (3,7-dimetiloct-6-en-1-il)etano-1,2-diamina.	94
Figura 19 – Espectro de RMN de ^{13}C do N1, N3- <i>bis</i> (3,7-dimetiloct-6-en-1-il)etano-1,2-diamina.	94
Figura 20 – Espectro de fragmentação de massas do (4 <i>S</i> ,7 <i>R</i>)-7-isopropil-4-metiloxepan-2-ona.	95
Figura 21 – Espectro de infravermelho do (4 <i>S</i> ,7 <i>R</i>)-7-isopropil-4-metploxepan-2-ona.	95
Figura 22 – Espectro de RMN de ^1H do (4 <i>S</i> ,7 <i>R</i>)-7-isopropil-4-metiloxepan-2-ona.	96
Figura 23 - Espectro de RMN de ^{13}C do (4 <i>S</i> ,7 <i>R</i>)-7-isopropil-4-metiloxepan-2-ona.	96
Figura 24 – Espectro de fragmentação de massas do (3 <i>S</i> , 6 <i>R</i>)-metil 6-hidroxi-3,7-dimetiloctanoato.	97
Figura 25 – Espectro de infravermelho do (3 <i>S</i> , 6 <i>R</i>)-metil 6-hidroxi-3,7-dimetiloctanoato.	97
Figura 26 – Espectro de RMN de ^1H do (3 <i>S</i> , 6 <i>R</i>)-metil 6-hidroxi-3,7-dimetiloctanoato.	98
Figura 27 – Espectro de RMN de ^{13}C do (3 <i>S</i> , 6 <i>R</i>)-metil 6-hidroxi-3,7-dimetiloctanoato.	98

7,11-dimetildodeca-10-en-5-ol

Dados espectrais:

E.M. m/z (abundância relativa %): 212 (1); 194 (1); 155 (6); 137 (9); 127 (64); 109 (58); 96 (23); 95 (55); 82 (100); 81 (83); 69 (88); 67 (47); 55 (37); 41 (68).

M.M. 212,21 g mol⁻¹

IV (cm⁻¹): 735, 825, 841, 901, 1026, 1051, 1121, 1377, 1454, 1643, 2729, 2860, 2928, 2959, 3377.

RMN de ¹H (400 MHz - CDCl₃) δ (ppm): 0,92 (t, J = 6,6 Hz, 3H); 0,96 (d, J = 6,8 Hz, 3H); 1,2 (m, 2H) 1,3 (m, 5H) 1,4 (m, 5 H); 1,63 (s, 3H) 1,7 (s, 3H) 2,0 (m, 2H) 3,7 (1H) 5,1 (m, 1H).

RMN de ¹³C (100 MHz CDCl₃) δ (ppm): 14,0; 17,6; 19,2; 20,3; 22,7; 25,4; 25,5; 25,7; 27,7; 27,9; 28,9; 29,3; 36,7; 37,5; 37,9; 38,1; 44,9; 45,1; 69,6; 70,0; 124,8; 131,1; 131,2.

Figura 1 – Espectro de Fragmentação de massas do 7,11-dimetildodeca-10-en-5-ol.

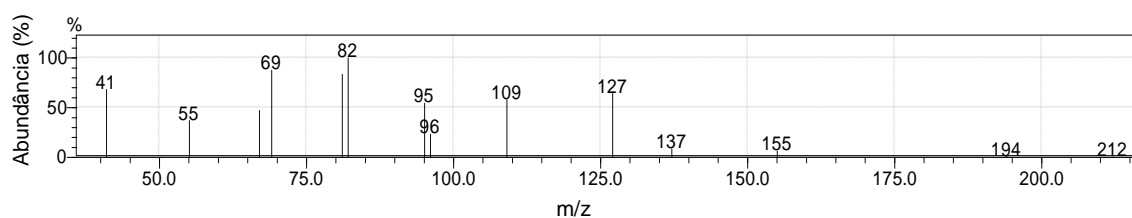


Figura 2 – Espectro de infravermelho do 7,11-dimetildodeca-10-en-5-ol.

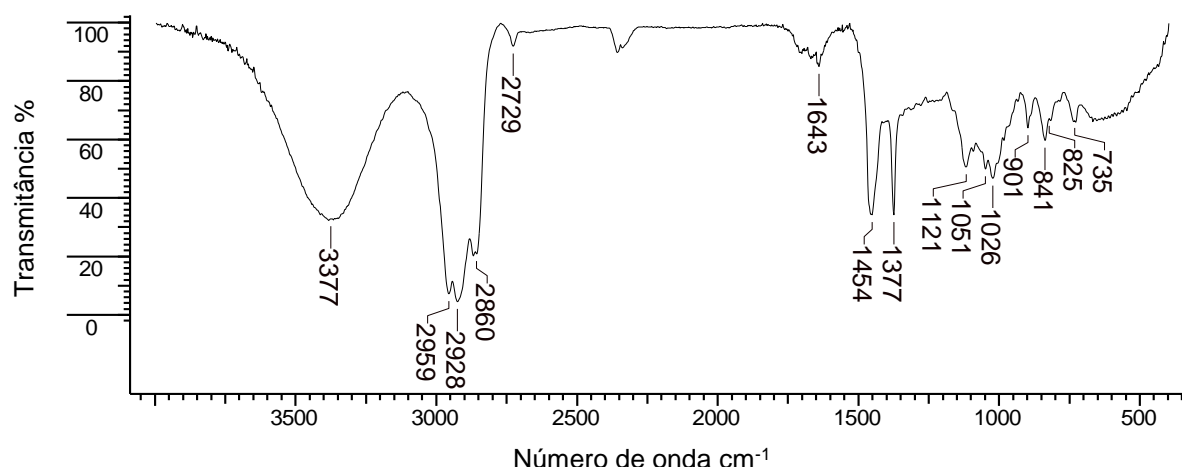


Figura 3 – Espectro de RMN de ^1H do 7,11-dimetildodeca-10-en-5-ol.

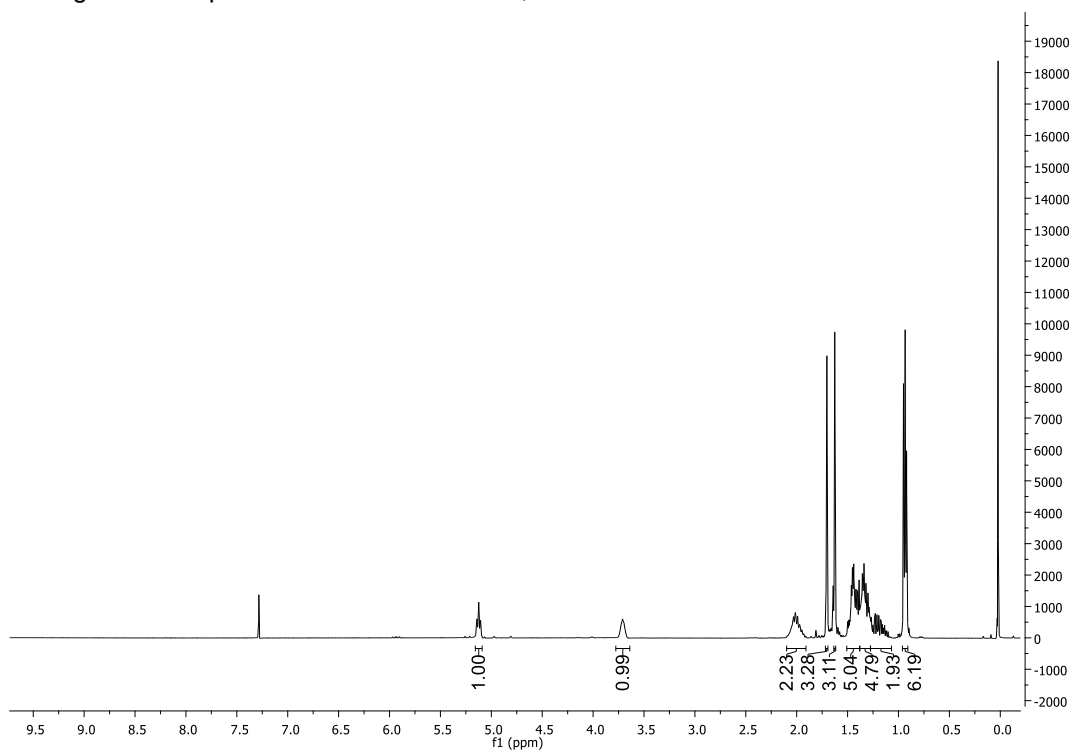
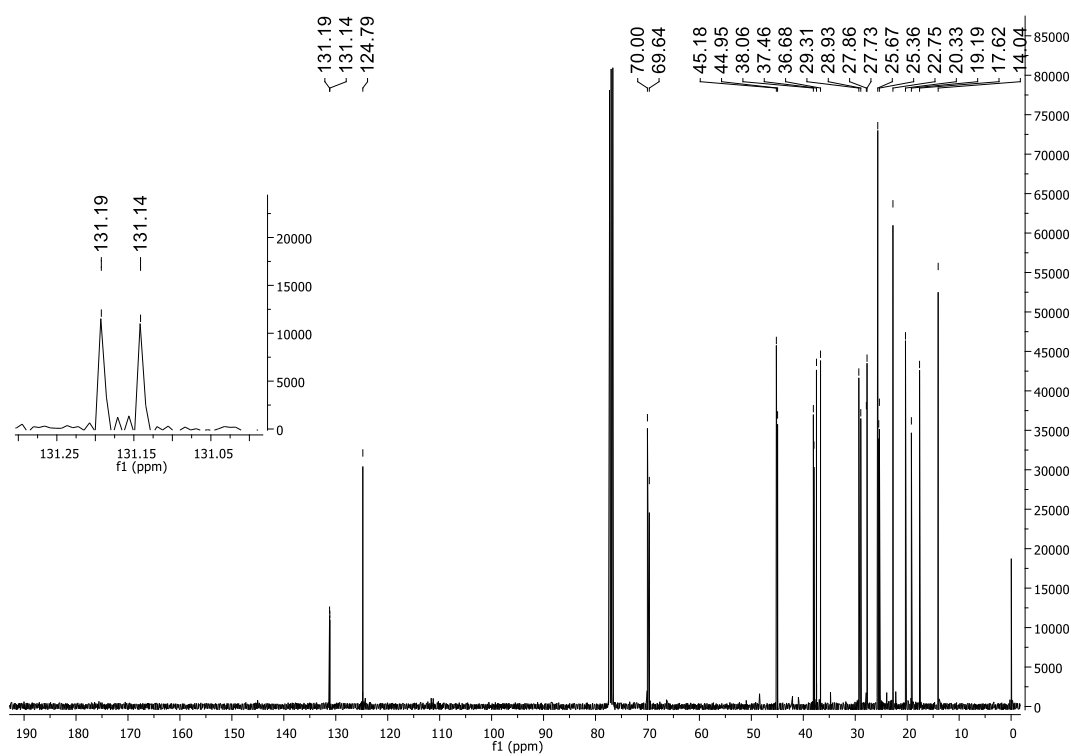


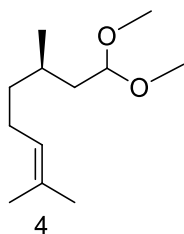
Figura 4 – Espectro de RMN de ^{13}C do 7,11-dimetildodeca-10-en-5-ol.



8,8-dimetoxi-2,6-dimetiloct-2-eno

Dados espectrais:

E.M. m/z (abundância relativa %): 199 (2); 185 (2); 168 (3); 121 (62); 95 (36); 86 (21); 85 (35); 81 (37); 75 (100); 69 (29); 67 (19); 55 (21); 47 (17); 41 (38).

 $C_{12}H_{24}O_2$ M.M. 200,18 g mol⁻¹

IV (cm⁻¹): 548, 582, 741, 829, 914, 966, 1055, 1126, 1192, 1377, 1458, 1647, 1732, 2926, 3491.

RMN de ¹H (400 MHz - CDCl₃) δ (ppm): 0,94 (d, J = 6,6 Hz, 3H) 1,21 (m, 2H) 1,38 (m, 2H) 1,62 (s, 3H) 1,63 (m, 1H) 1,69 (s, 3H) 2,0 (m, 2H) 3,32 (s, 3H) 3,34 (s, 3H) 4,47 (t, J = 5,6 Hz, 1H) 5,11 (t, J = 7,1 Hz, 1H)

RMN de ¹³C (100 MHz CDCl₃) δ (ppm): 17,6; 19,7; 25,4; 25,7; 28,8; 37,4; 39,5; 52,2; 52,7; 103,3; 124,7; 131,2.

Figura 5 – Espectro de fragmentação de massas do 8,8-dimetoxi-2,6-dimetiloct-2-eno.

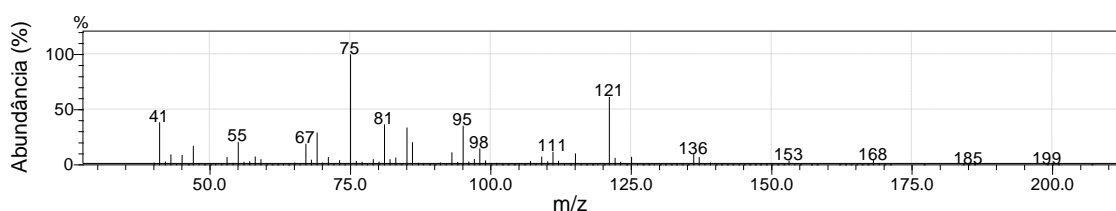


Figura 6 – Espectro de infravermelho do 8,8-dimetoxi-2,6-dimetiloct-2-eno.

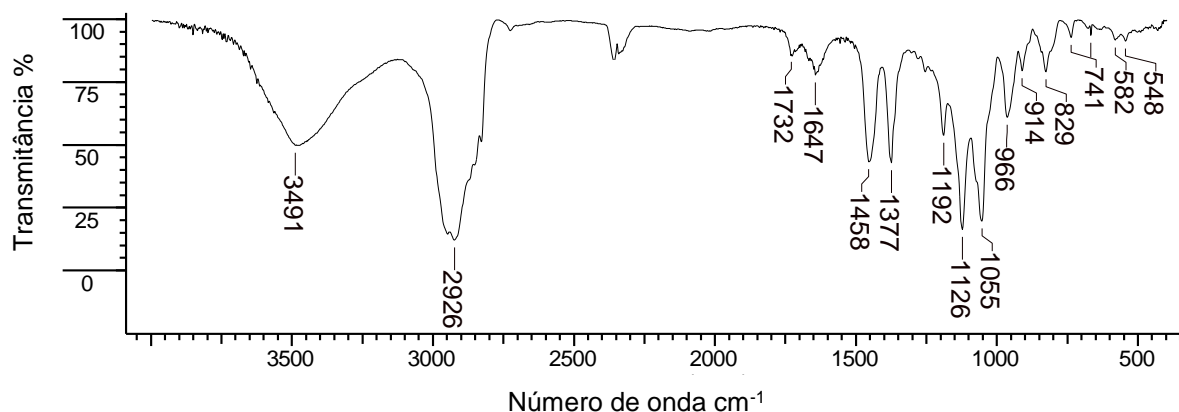


Figura 7 – Espectro de RMN de ^1H do 8,8-dimetoxi-2,6-dimetiloct-2-eno.

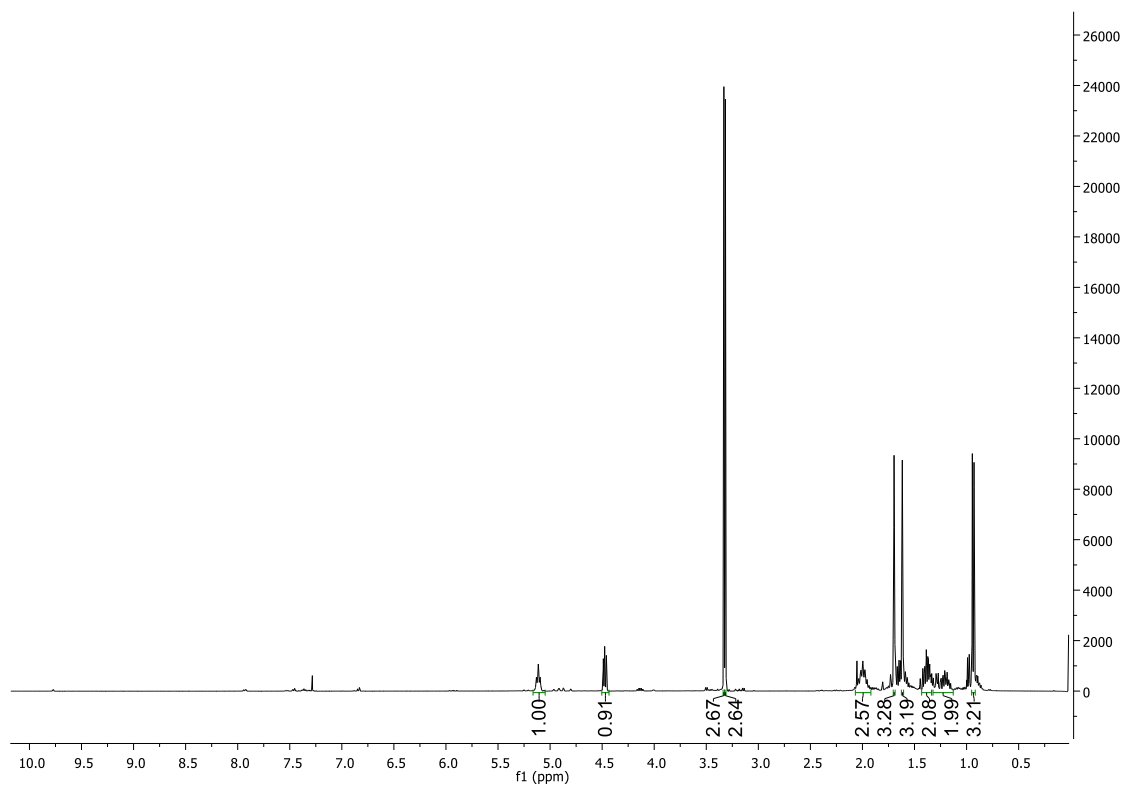
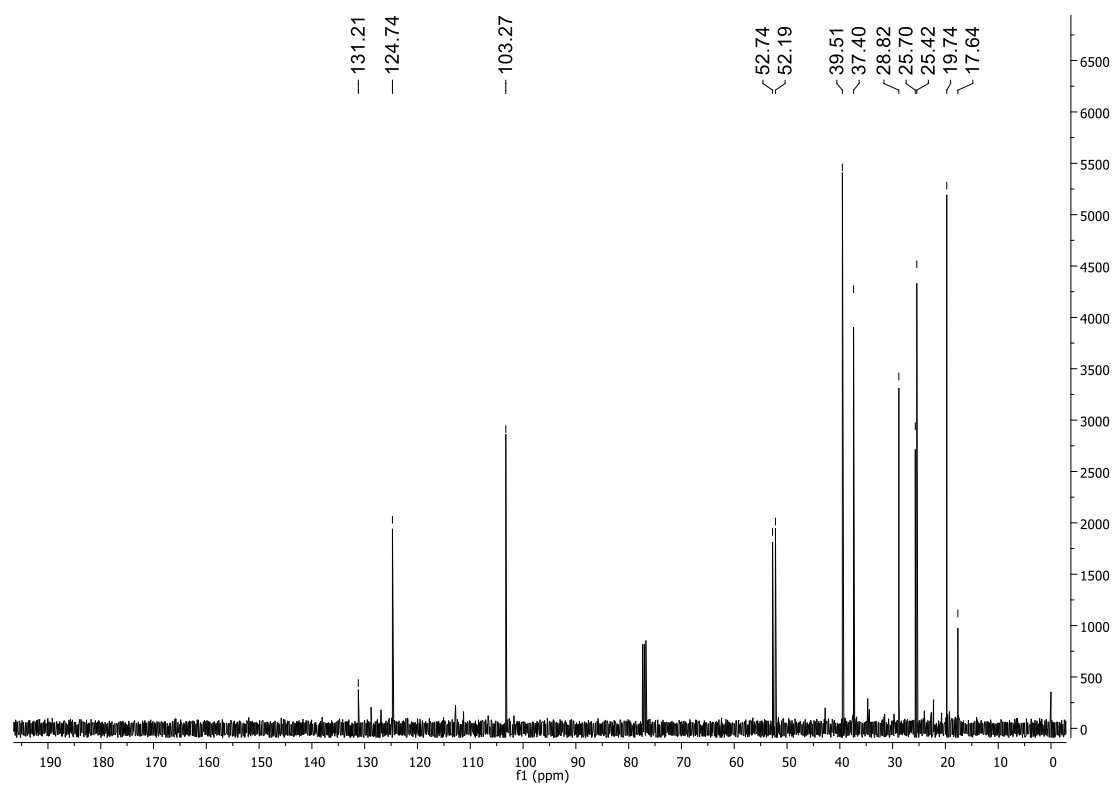
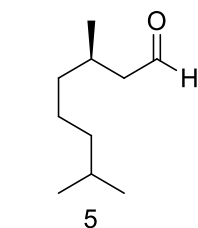


Figura 8 – Espectro de RMN de ^{13}C do 8,8-dimetoxi-2,6-dimetiloct-2-eno.



Preparação do 3,7-dimetiloctanal

Dados espectrais:


 $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}$
M.M. 156,18 g mol⁻¹

E.M. m/z (abundância relativa %): 112 (50); 97 (23); 84 (44); 69 (82); 71 (94); 56 (100).

IV (cm⁻¹): 525, 679, 1018, 1157, 1373, 1466, 1728, 2716, 2947, 3441.

RMN de ¹H (400 MHz - CDCl₃) δ (ppm): 0,88 (d, *J* = 6,6 Hz, 6H), 0,98 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H), 1,2 (m, 6H), 1,6 (m, 6H), 1,8 (m, 1H), 2,0 (m, 1H), 2,4 (m, 1H), 9,7 (t, *J* = 2,41 Hz, 1H).

RMN de ¹³C (100 MHz CDCl₃) δ (ppm): 20,0; 22,5; 22,6; 24,6; 25,6; 27,9; 28,2; 37,2; 39,0; 51,1; 67,96; 203,1.

Figura 9 – Espectro de fragmentação de massas do 3,7-dimetiloctanal.

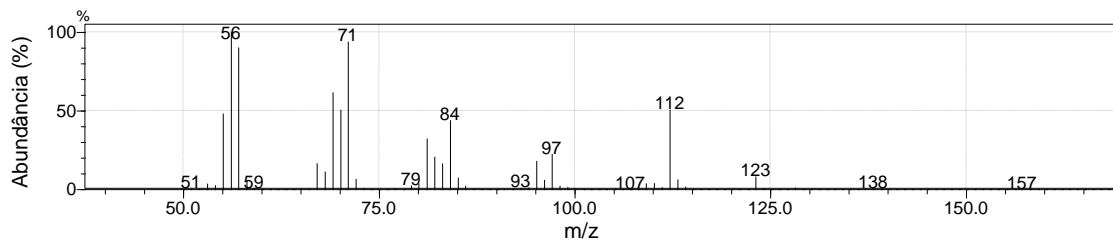


Figura 10 – Espectro de infravermelho do 3,7-dimetiloctanal.

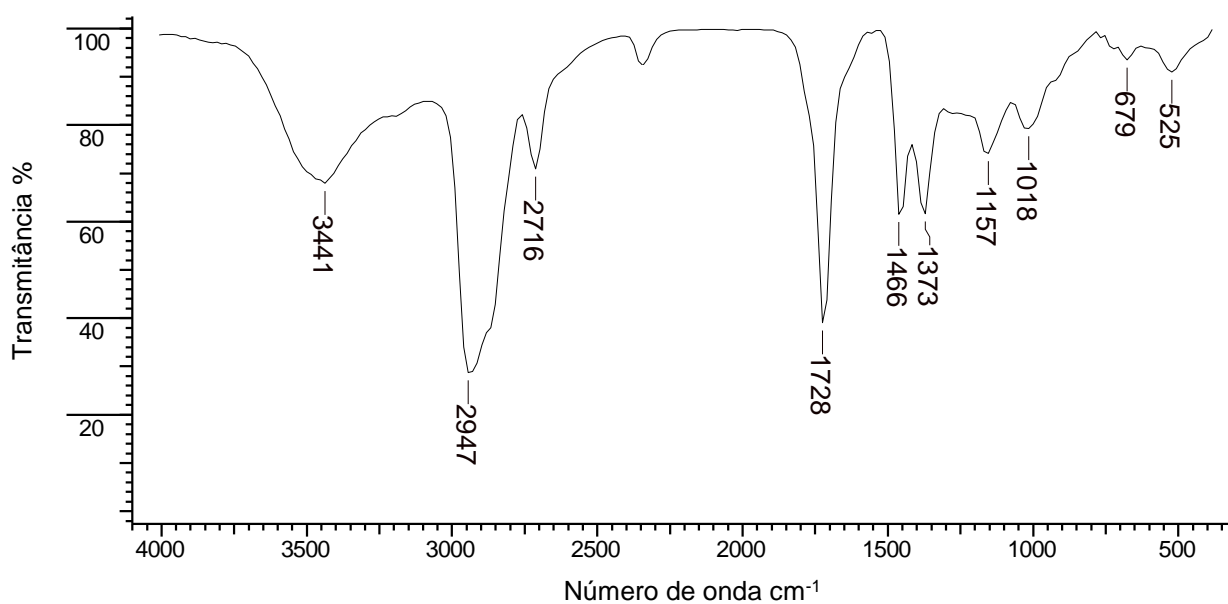


Figura 11 – Espectro de RMN de ^1H do 3,7-dimetiloctanal.

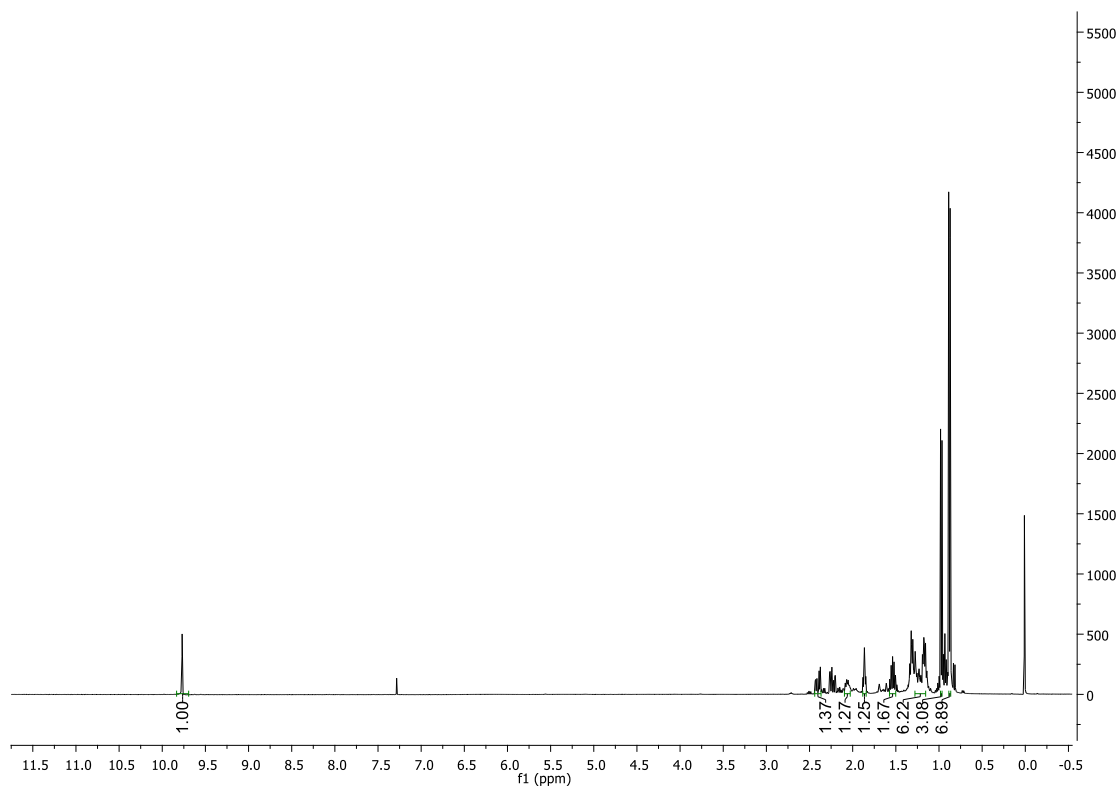
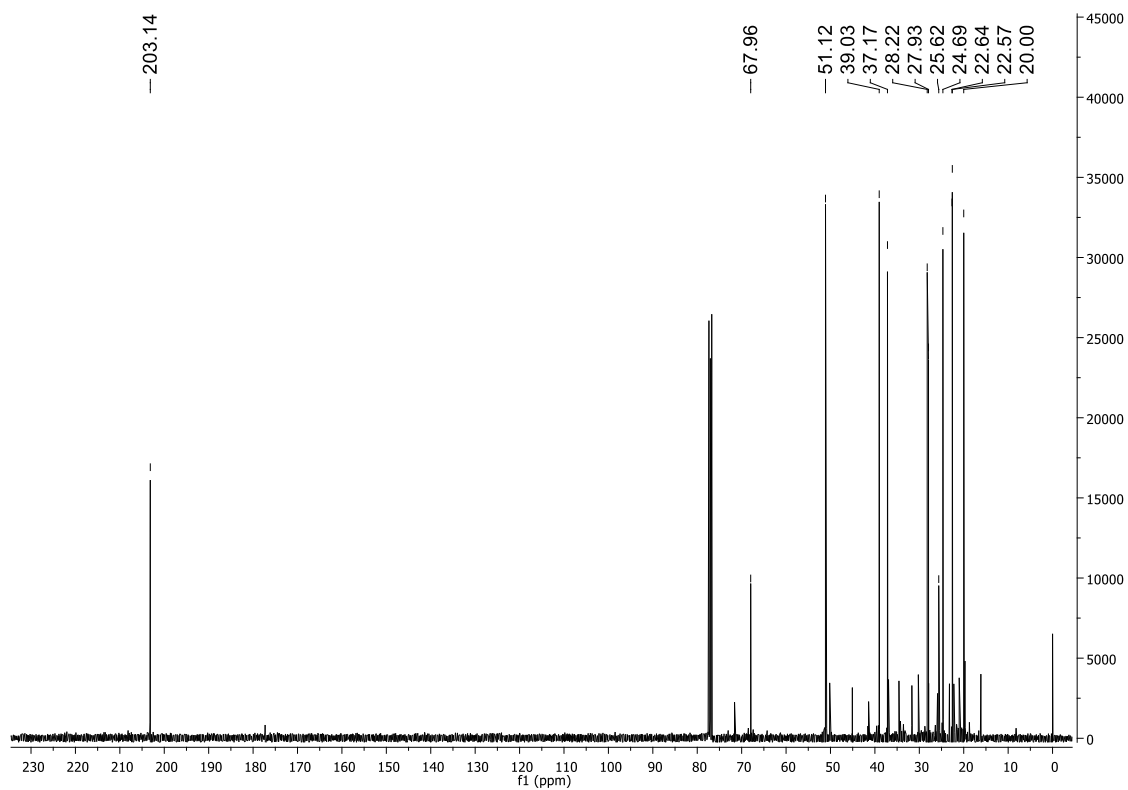


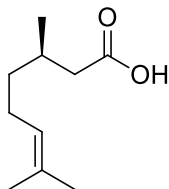
Figura 12 – Espectro de RMN de ^{13}C do 3,7-dimetiloctanal.



Ácido citronílico

Dados espectrais:

IV (cm^{-1}): 478, 617, 679, 833, 941, 1234, 1296, 1435, 1713, 2932.



6

 $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_2$ M.M. 170,13 g mol^{-1}

RMN de ^1H (200 MHz - CDCl_3) δ (ppm): 0,98 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H), 1,30 (m, 3H), 1,6 (s, 3H), 1,7 (s, 3H), 2,2 (m, 6H) 5,09 (t, $J = 7,12$ Hz, 1H).

RMN de ^{13}C (50 MHz CDCl_3) δ (ppm): 17,6; 19,6; 24,4; 25,7; 29,8; 36,7; 41,5; 124,2; 131,7; 179,5.

Figura 13 – Espectro de infravermelho do ácido citronílico.

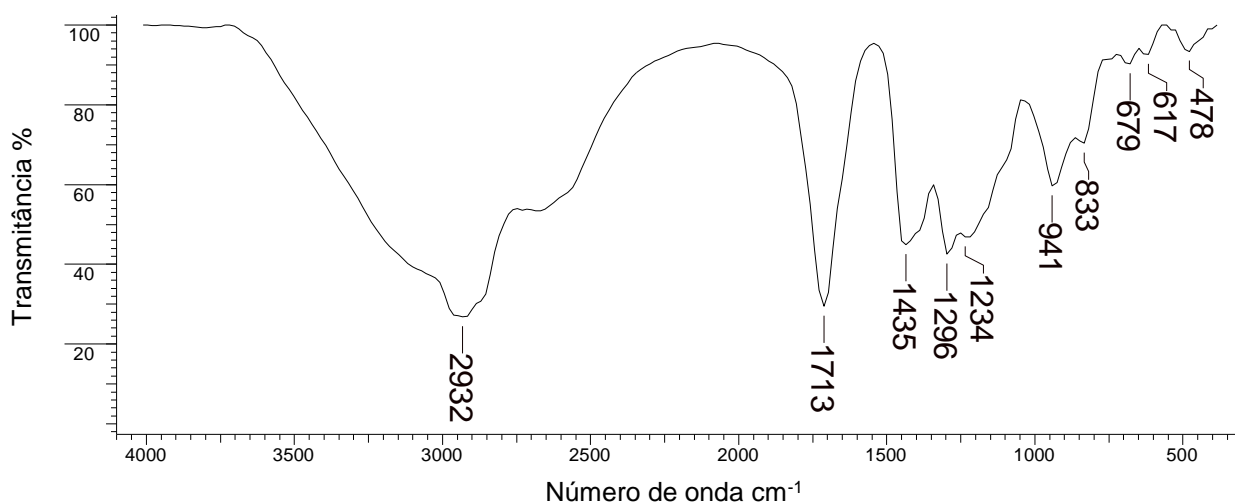
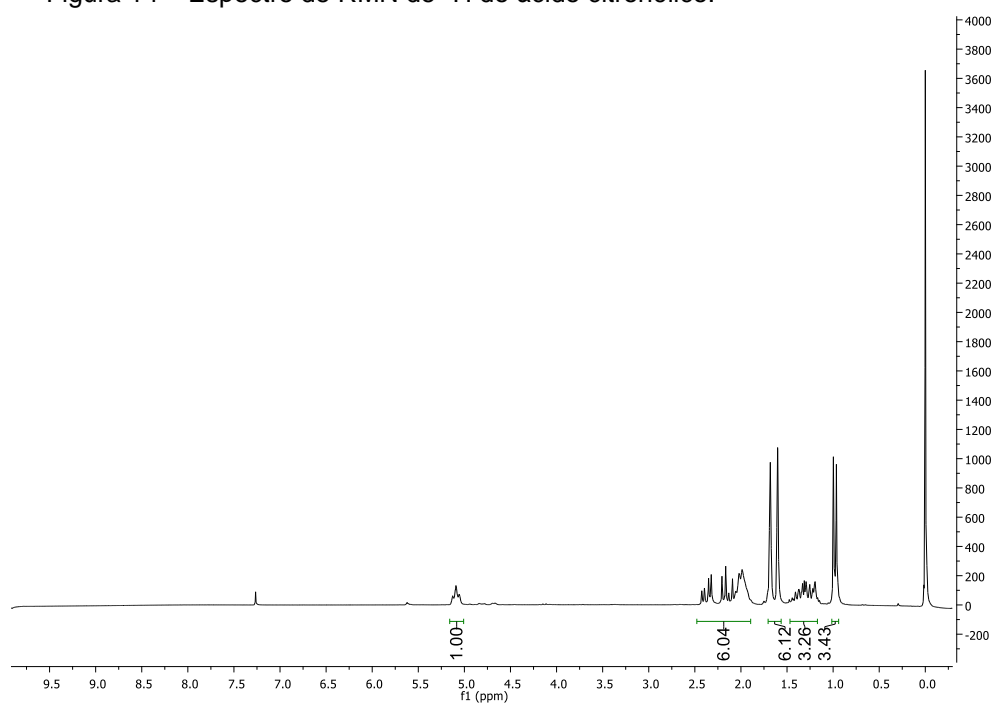
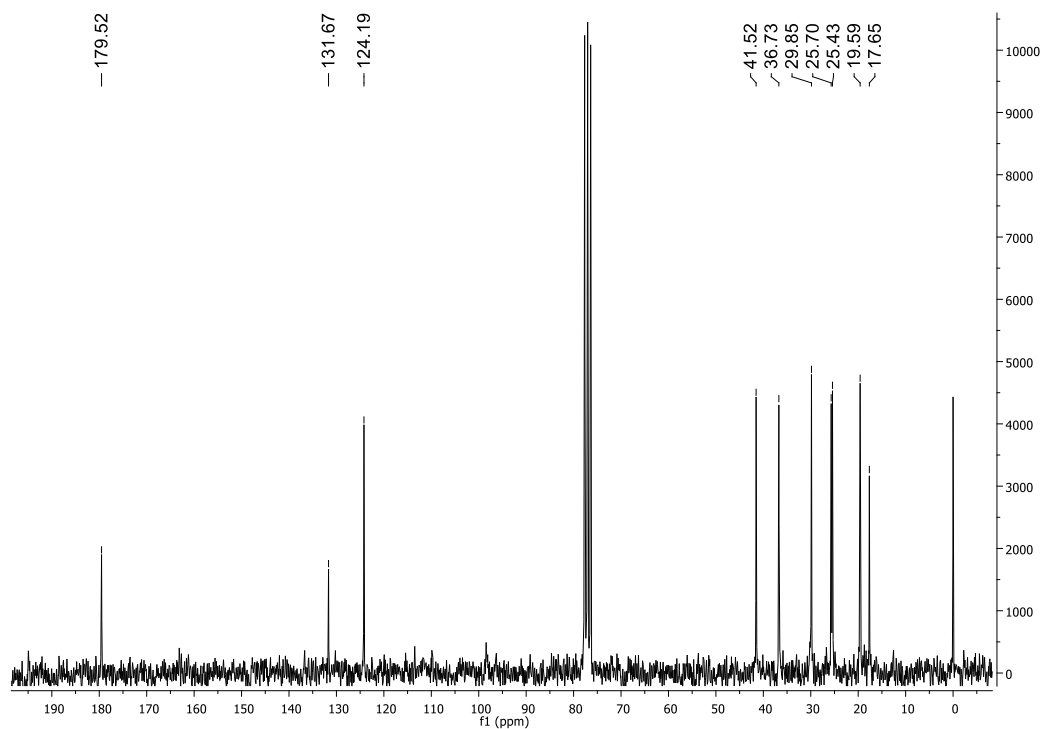


Figura 14 – Espectro de RMN de ^1H do ácido citronílico.Figura 15 – Espectro de RMN de ^{13}C do ácido citronílico.

N1, N3-*bis*(3,7-dimetiloct-6-en-1-il)etano-1,2-diamina

Dados espectrais:

E.M. m/z (abundância relativa %): 289 (11); 249 (7); 221 (25); 207 (37); 166 (46); 152 (19); 138 (13); 137 (24); 125 (13); 124 (29); 121 (15); 111 (16); 98 (100); 97 (49); 81 (37); 69 (57); 56 (38); 41 (67).

IV (cm^{-1}): 507, 600, 721, 845, 968, 1173, 1217, 1427, 1462, 2361, 2857, 2928, 2957.

RMN de ^1H (400 MHz - CDCl_3) δ (ppm): 0,91 (d, $J = 6,0$ Hz, 6H) 1,34 (m, 12H) 1,62 (s, 6H) 1,71 (s, 6H) 1,99 (m, 4H) 2,68 (m, 8H) 5,11 (m, 2H).

RMN de ^{13}C (100 MHz - CDCl_3) δ (ppm): 17,7; 19,5; 25,5; 26,7; 30,6; 36,4; 37,1; 37,3; 47,5; 48,1; 124,7; 131,28.

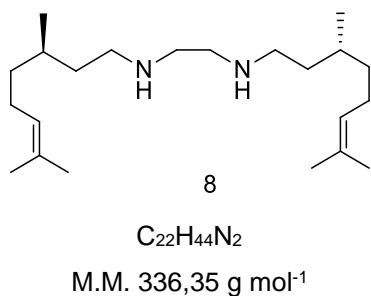


Figura 16 – Espectro de fragmentação de massas do N1, N3-*bis*(3,7-dimetiloct-6-en-1-il)etano-1,2-diamina.

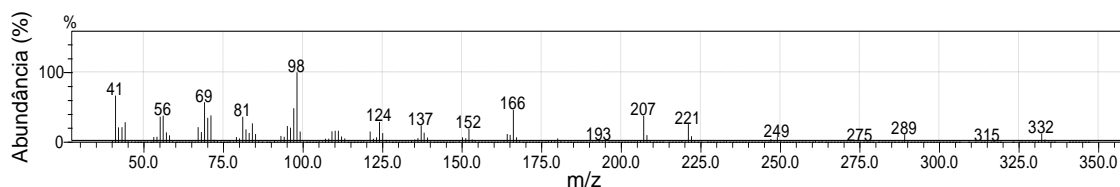


Figura 17 – Espectro de infravermelho do N1, N3-*bis*(3,7-dimetiloct-6-en-1-il)etano-1,2-diamina.

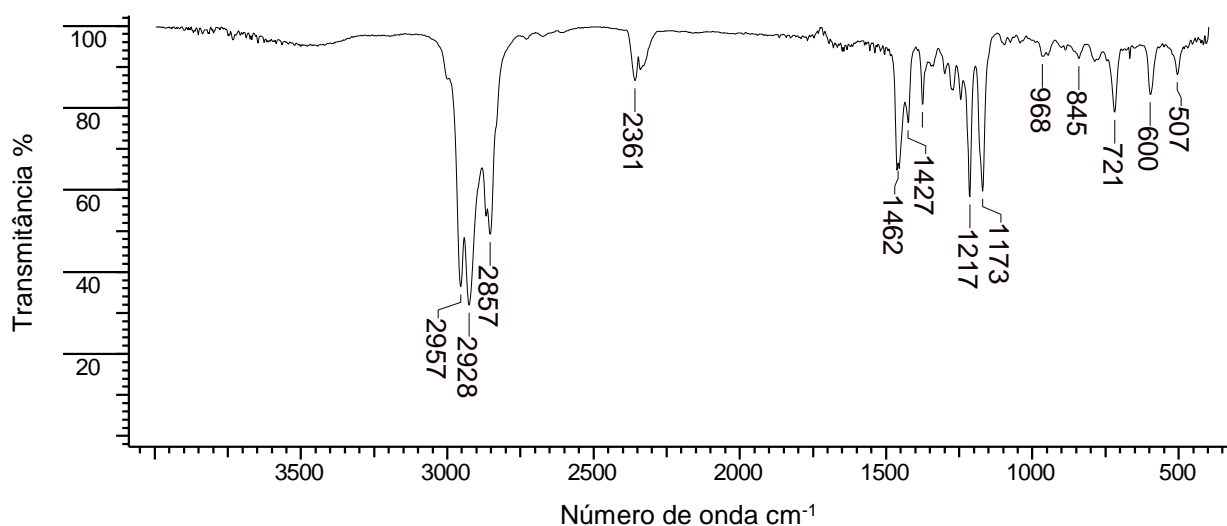


Figure 18 – Espectro de RMN de ^1H do N1, N3-*bis*(3,7-dimetiloct-6-en-1-il)etano-1,2-diamina.

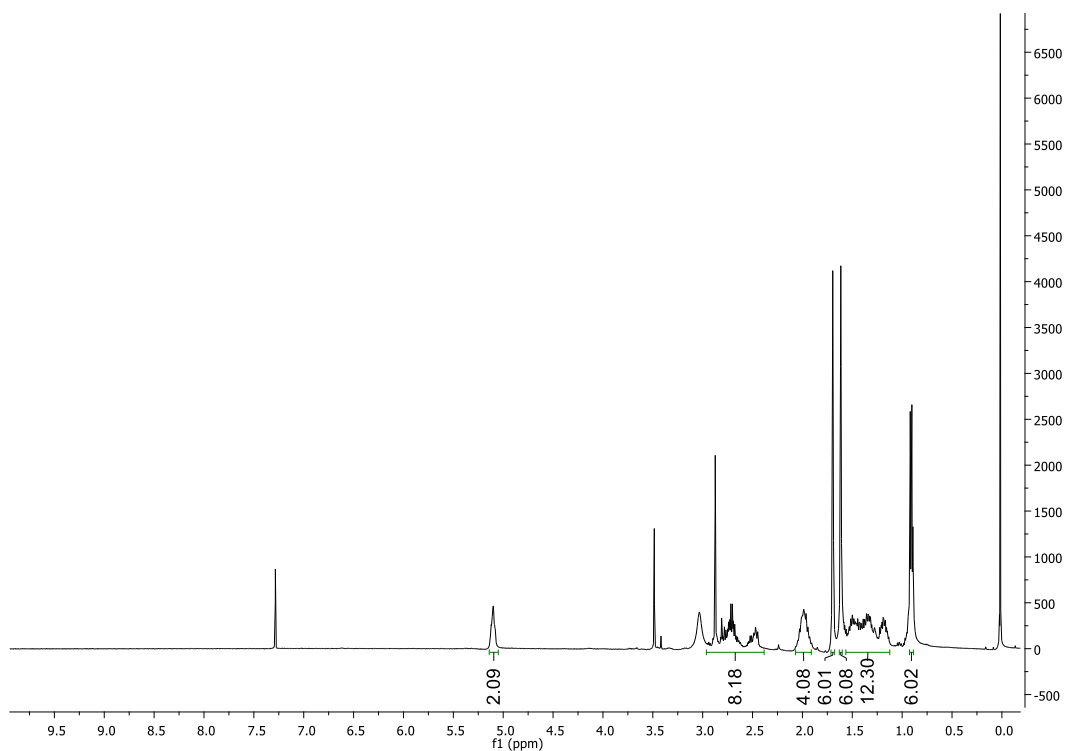
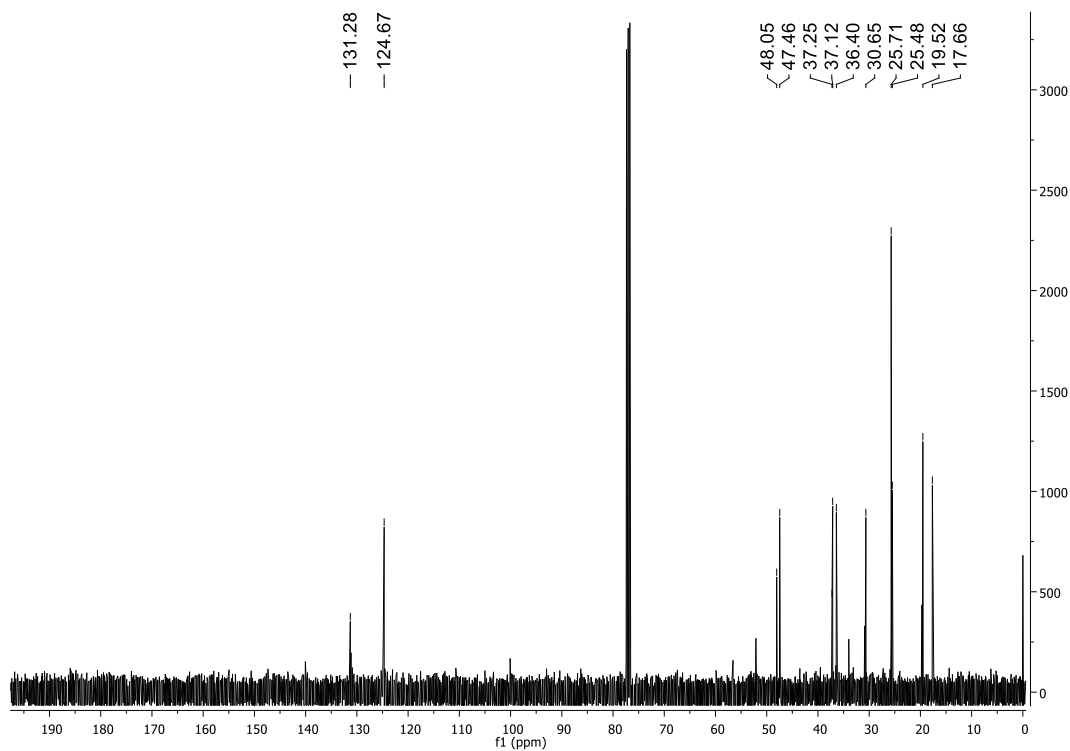


Figura 19 – Espectro de RMN de ^{13}C do N1, N3-*bis*(3,7-dimetiloct-6-en-1-il)etano-1,2-diamina.



(4*S*,7*R*)-7-isopropil-4-metiloxepan-2-ona

Dados espectrais:

E.M. m/z (abundância relativa %): 127 (51); 109 (10); 99 (55); 81 (100); 69 (71); 55 (50).

IV (cm^{-1}): 1018, 1111, 1157, 1234, 1281, 1373, 1450, 1728, 2947.

RMN de ^1H (400 MHz - CDCl_3) δ (ppm): 0,95 (m, 9H), 1,5 (m, 2H), 1,6 (M, 2H), 1,7 (m, 2H), 1,9 (m, 2H) 2,5 (m, 1H) 4,14 (dd, $J = 7,19$ Hz, 1H).

RMN de ^{13}C (100 MHz CDCl_3) δ (ppm): 12,1; 20,7; 22,7; 25,3; 31,6; 34,6; 34,7; 42,6; 84,8; 174,9.

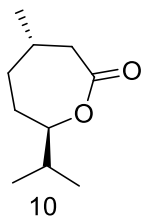
 $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_2$ M.M. 170,13 g mol^{-1}

Figura 20 – Espectro de fragmentação de massas do (4*S*,7*R*)-7-isopropil-4-metiloxepan-2-ona.

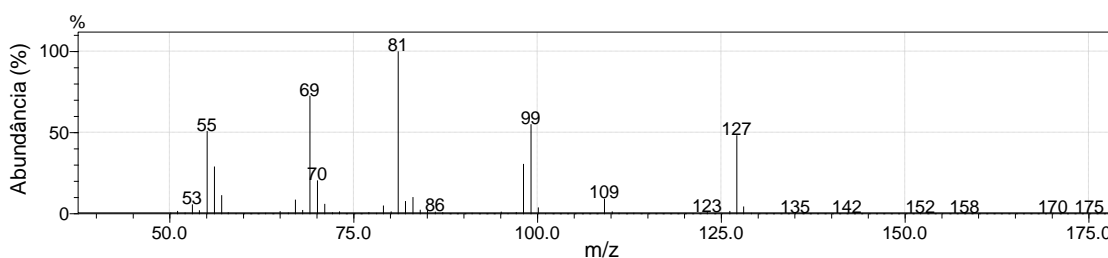


Figura 21 – Espectro de infravermelho do (4*S*,7*R*)-7-isopropil-4-metiloxepan-2-ona.

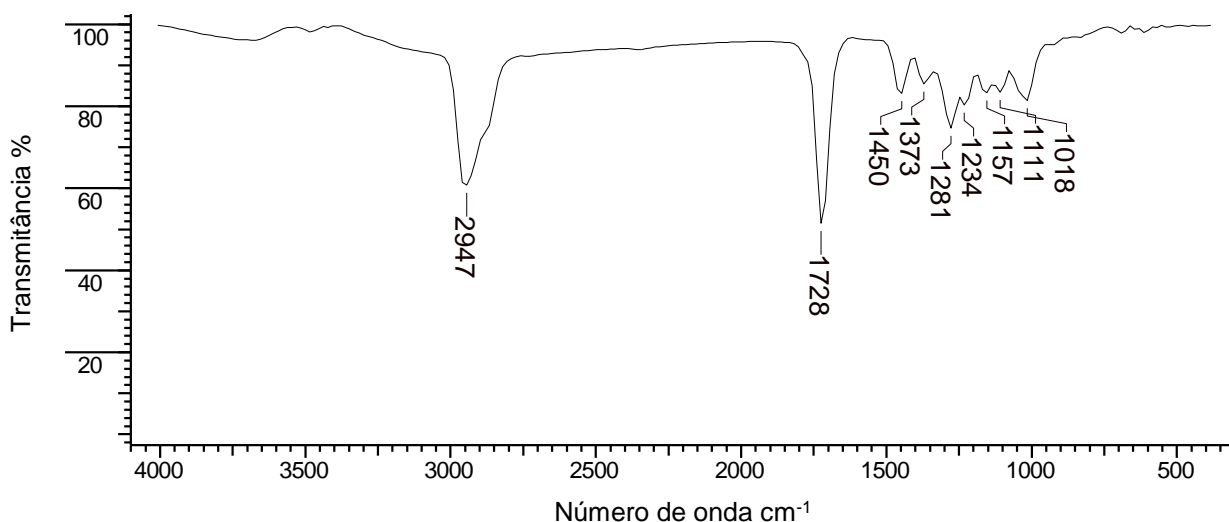


Figura 22 – Espectro de RMN de ^1H do (4*S*,7*R*)-7-isopropil-4-metiloxepan-2-ona.

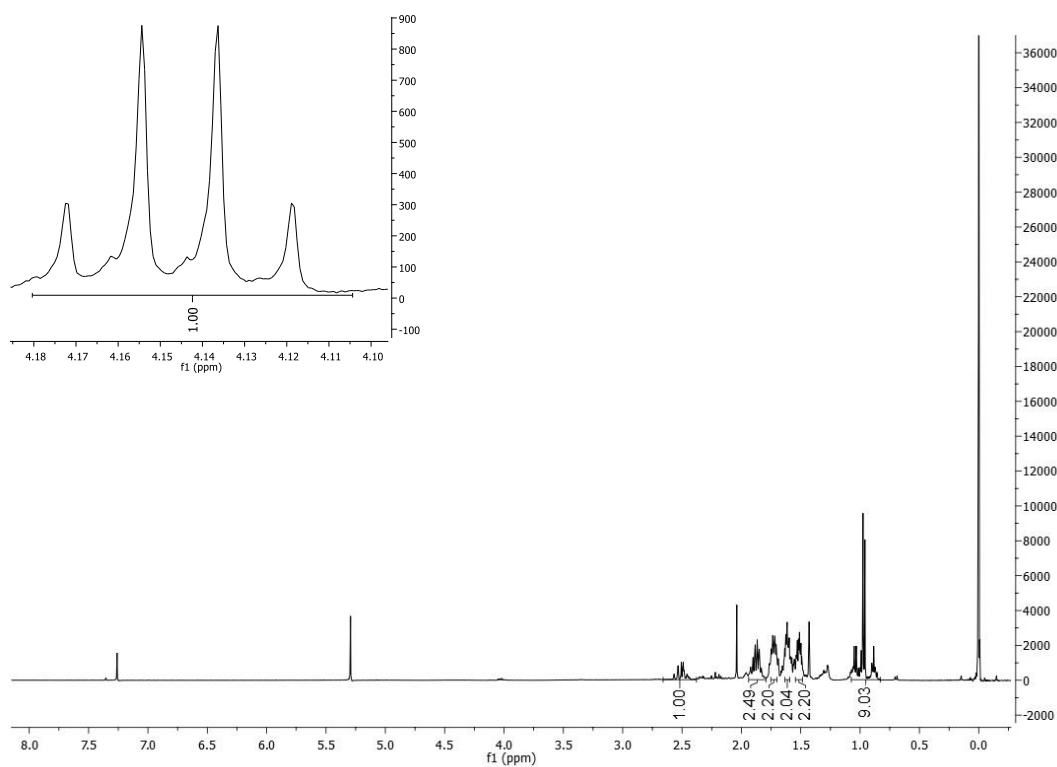
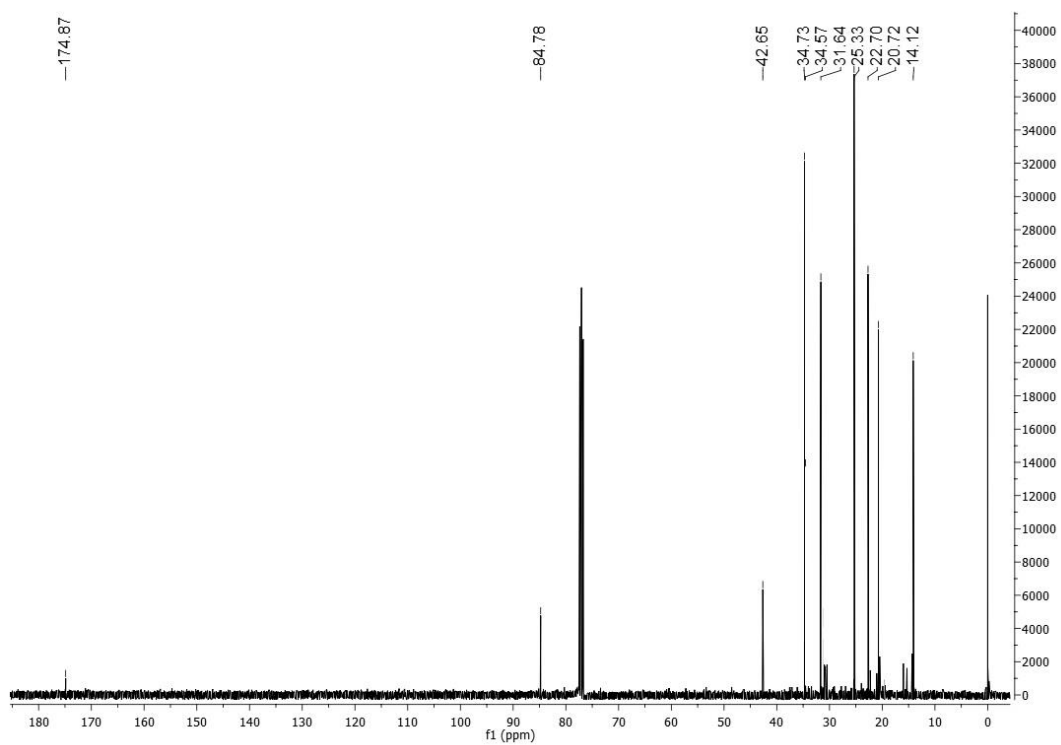
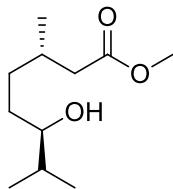


Figura 23 - Espectro de RMN de ^{13}C do (4*S*,7*R*)-7-isopropil-4-metiloxepan-2-ona.



(3*S*, 6*R*)-metil 6-hidroxi-3,7-dimetiloctanoato

Dados espectrais:



11

 $C_{11}H_{23}O_3$ M.M. 202,16 g mol⁻¹

E.M. m/z (abundância relativa %): 185 (1), 159 (18), 127 (100), 101 (25), 87 (18), 81 (44).

IV (cm⁻¹): 1003, 1204, 1265, 1373, 1450, 1728, 2947, 3456.

RMN de ¹H (200 MHz - CDCl₃) δ (ppm): 0,91 (d, $J = 6,38$ Hz, 3H), 0,93 (d, $J = 6,38$ Hz, 3H), 0,96 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H), 1,24 (m, 2H), 1,36 (m, 2H), 1,53 (m, 2H), 1,66 (m, 2H), 2,23 (m, 2H), 3,34 (m, 1H), 3,67 (s, 3H).

RMN de ¹³C (50 MHz CDCl₃) δ (ppm): 16,9; 18,7; 19,9; 30,5; 31,4; 33,0; 33,4; 41,4; 51,4; 76,7; 173,7.

Figura 24 – Espectro de fragmentação de massas do (3*S*, 6*R*)-metil 6-hidroxi-3,7-dimetiloctanoato.

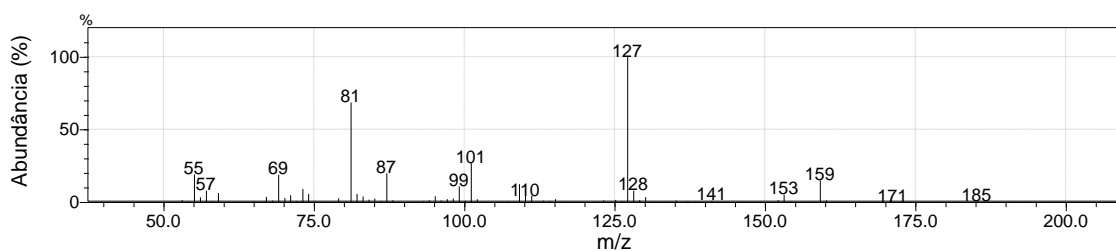


Figura 25 – Espectro de infravermelho do (3*S*, 6*R*)-metil 6-hidroxi-3,7-dimetiloctanoato.

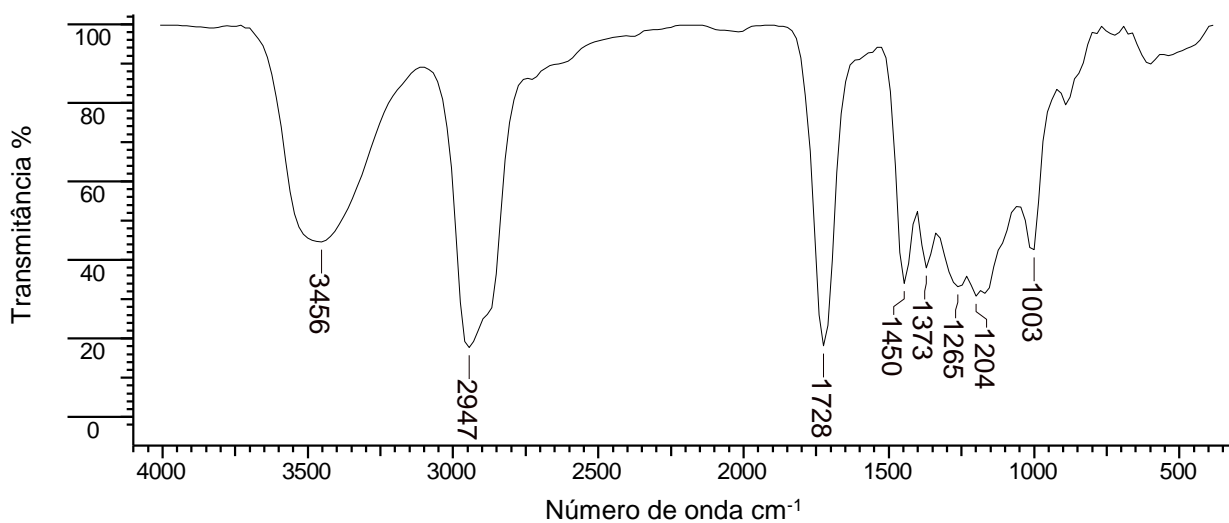


Figura 26 – Espectro de RMN de ^1H do (3*S*, 6*R*)-metil 6-hidroxi-3,7-dimetiloctanoato.

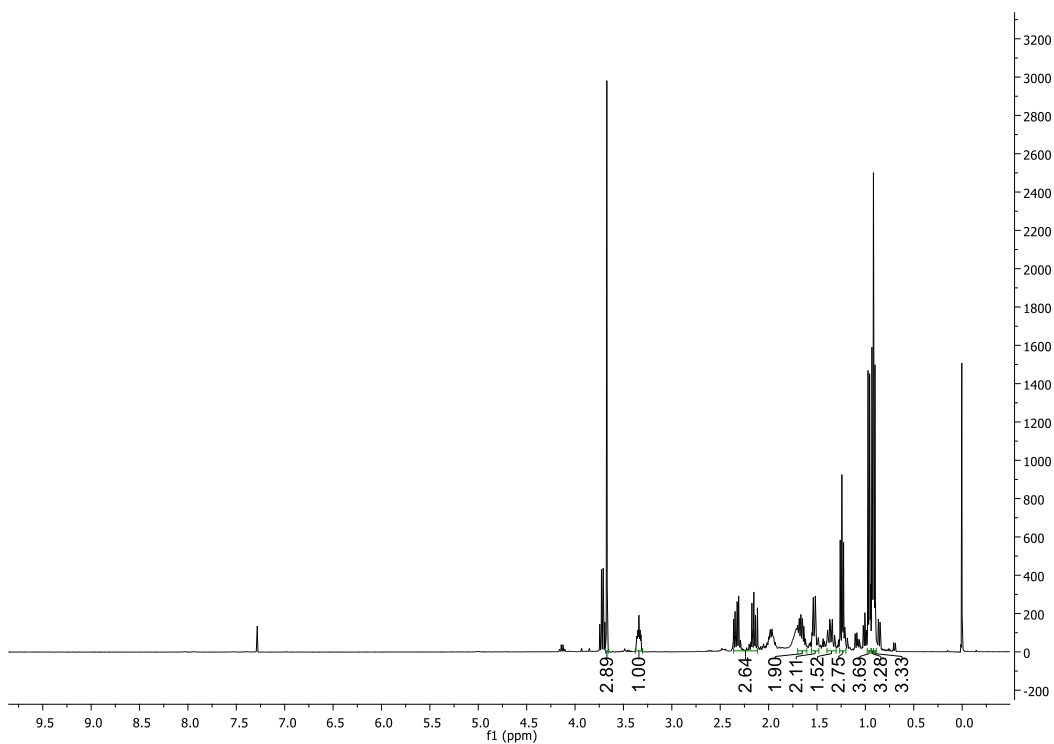


Figura 27 – Espectro de RMN de ^{13}C do (3*S*, 6*R*)-metil 6-hidroxi-3,7-dimetiloctanoato.

